



**Universidade Federal do Paraná**

---

ENELISE MARCELLE AMADO

# **O efeito do chumbo sobre a fisiologia celular branquial de crustáceos**

---

Curitiba  
2010

ENELISE MARCELLE AMADO

# O efeito do chumbo sobre a fisiologia celular branquial de crustáceos

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Biologia Celular, com área de concentração Fisiologia.

Orientadora: Dra. Marta Marques de Souza

Co-Orientadora: Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire


Curitiba  
2010

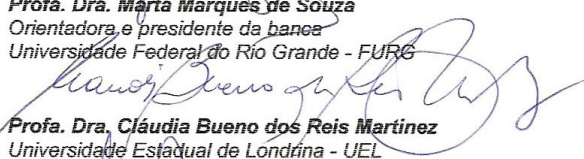
## PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia  
Setor de Ciências Biológicas  
Universidade Federal do Paraná  
Instituto Carlos Chagas (ICC)

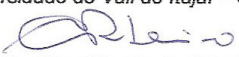
### PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

  
**Prof. Dra. Marta Marques de Souza**  
Orientadora e presidente da banca  
Universidade Federal do Rio Grande - FURG

  
**Prof. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez**  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

  
**Prof. Dr. Marcos Luiz Pessatti**  
Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI

  
**Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro**  
Universidade Federal do Paraná

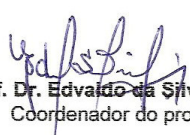
  
**Prof. Dr. Francisco Filipak Neto**  
Universidade Federal do Paraná

E tendo como suplentes,

**Prof. Dr. Ricardo Fernandez Perez**  
Universidade Federal do Paraná

**Prof. Dra. Viviane Prodócimo**  
Universidade Federal do Paraná

Após arguir a doutoranda **Enelise Marcelle Amado**, em relação ao seu trabalho de tese intitulada: **"O efeito do chumbo sobre a fisiologia celular branquial de crustáceos"**, é de parecer favorável à APROVAÇÃO da acadêmica, habilitando-o(a) ao título de DOUTOR em Biologia Celular e Molecular, a área de concentração em Fisiologia. A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas nas Normas Internas deste Programa de Pós-Graduação.

  
**Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade**  
Coordenador do programa

Curitiba, 15 de setembro de 2010



*“The fallacies and foibles of human thinking generate systematic and predictable trouble when we try to grasp the complexities of external reality. Among these foibles, our persistent attempts to build abstractly beautiful, logically impeccable, and comprehensively simplified systems always lead us astray”.*

Stephen Jay Gould

## Agradecimentos

Sempre gostei de ler os agradecimentos em monografias, dissertações e teses. Acredito que essa é a única parte do documento em que o autor pode colocar a emoção na frente da razão e fazer um balanço de todo o tempo investido no trabalho, de todas as dificuldades, de todas as conquistas e frustrações. E assim, homenagear sinceramente as pessoas que de qualquer forma estiveram envolvidas nesse processo.

E não poderia ser diferente. Gostaria de começar homenageando em especial duas pessoas, a minha “mãe” e a minha “tia” científica: Dra Marta Marques de Souza e Dra Carolina Arruda Freire.

Com a Marta, a orientadora, lá se vão 10 anos de convivência. Na ocasião da minha defesa de mestrado escrevi assim: “À minha orientadora Dra. Marta Marques de Souza por todos esses 6 anos que estamos juntas, pela paciência e dedicação de sempre, pelo carinho e pela amizade, pelo modo “relax” de conduzir todo o processo, por sempre ter acreditado e confiado em mim e pela enorme contribuição na minha formação científica”. Reitero tudo o que disse. E acrescento. Muito obrigada por mais esses 4 anos! Muito obrigada por ter aceitado me orientar a distância - só porque eu queria morar em Curitiba. Muito obrigada por ter permitido que aos poucos eu fosse soltando da sua mão e, às vezes até meio que de forma inconseqüente, trilhando meu próprio caminho. Muito, muito obrigada pela confiança e pela paciência!!

Carol, a co-orientadora. Na verdade acho que a Carol não teve muita escolha.... de repente eu estava dentro do laboratório dela. Então eu só posso dizer muito obrigada por ter me acolhido e aberto as portas do seu laboratório pra mim - só porque eu queria morar em Curitiba. Muito obrigada por todos os ensinamentos, pela confiança em mim depositada na execução de projetos paralelos, pela convivência, por tudo! Gostaria que soubesse que aprendi muito com você e dentro do seu laboratório. Serei sempre grata!

Que sorte eu tive em tê-las no meu caminho! Vocês são o exemplo que eu quero seguir, o espelho da profissional que desejo ser, cada uma a sua maneira. E sou muito feliz por ter tido a oportunidade de extrair o que cada uma tem de melhor. MUITÍSSIMO Obrigada!

Ainda na parte sentimental dos agradecimentos quero homenagear minha família, minha base, meu suporte, meu tudo! Natalina de Mattos Amado, a melhor mãe do mundo, Ademar Amado, o melhor pai do mundo, e os queridos irmãos Rodrigo Fabiano Amado, Rafael Fernando Amado e Guilherme André Amado. Vocês são tudo pra mim! Pai e mãe, quero agradecer por tudo que fizeram por mim até hoje, por sempre terem acreditado e por continuarem acreditando. Por todo o suporte, por todo o apoio. Por terem aceitado, às vezes acho que com uma certa resignação, a única filha ter ido morar longe de vocês pra ir atrás de fazer o que realmente gosta. Todas as minhas conquistas são pra retribuir o amor, carinho e confiança de vocês. Muito Obrigada Família!!

Aos agradecimentos práticos, mas não menos importantes!:

À Fundação Araucária por 12 meses de bolsa e ao CNPq por outros 27 meses e pela taxa de bancada.

À comunidade de pescadores da praia de Ipanema, Pontal do Paraná –Pr. Em especial ao Seu Pedro “barba”, ao Daniel, “Dino” e “Fela”.

Aos membros da banca por terem aceitado o convite e pela disposição em ler e contribuir com esse trabalho: Dra Cláudia Bueno dos Reis Martinez, Dr Marcos Luiz Pessatti, Dr Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, Dr Francisco Filipak Neto, Dr Ricardo Fernandez Perez e Dra Viviane Prodocimo

A Dra Viviane Prodocimo por compartilhar do mesmo entusiasmo e assim ser também fonte de inspiração.

Aos amigos e colegas do LFCO, pelo exercício diário de compartilhar, de aprender e ensinar: Luciana Rodrigues de Souza, Ivonete Aparecida dos Santos, Marcos Paulo Trindade da Veiga, Giovana Carstens Castelhana, Anieli Cristina Maraschi, Silvia Millan Gutierrez, Aline Kloh, Hugo Ultramar Batista, Juliane Ceron, Jean Ricardo Simões Vitule, Ligia Strey.

Ao Prof. Dr. Luís Cláudio Fernandes e todos seus alunos pelo livre uso dos equipamentos e do espaço em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça pela doação de verapamil

Aos colegas Ms. Alexandre de Oliveira Fernandes e Ms. Andréa Martini Ribeiro, assim como a todos os alunos do laboratório de ecofisiologia animal – UEL - pelo auxílio nas dosagens de chumbo e da atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$

À secretária do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Marlene Bonifácio Camargo

Aos amigos por incontáveis motivos, pela parceria de sempre, pelo apoio no final e por tornar a vida mais leve e feliz! Heloísa Helena “loli” Paro de Oliveira; Michelle “mi” Scot Winters; Letícia “mini” Scot Winters; Manoelle “mano” Scot Winters, na verdade a toda a família Scot Winters (Dona Yara, Seu Scot, Marcelle e Gabizinha) e também à família Diniz (tia Yeda, tio Beto, Pri e Pati); Renata “fia” Maria Simon; Thiago “amigo” Camillo Silvestre; Milton “1000ton” Camillo Jr; Victor Camillo Ferreira; Valderval “val” de Oliveira Filho; Milton “1000tão” Bastos Henriques Jr; Elaine “nani” Fade; Rodrigo Torrezan; Angelita “angi” Freitas; Leonardo “léo” Barros; Caroline “go” Carvalho Fornos, Rodrigo “go” Fornos; Luciana “lu” Nakagaki; Luiz Gustavo “gus” Moraes Barros; Lenir Filho e Patrícia Olivo Poiani.

À Lanka por ser a melhor companhia canina que alguém pode ter.

## Resumo

As brânquias de crustáceos constituem uma interface seletiva entre o ambiente externo e o meio interno e sua função e localização expõe suas células a alterações do ambiente aquático, como, por exemplo, variações de salinidade e presença de contaminantes. Metais como o chumbo (Pb) têm sido registrados em ecossistemas aquáticos em níveis acima do estabelecido pela legislação brasileira. Alguns estudos indicam que crustáceos decápodes acumulam metais em órgãos como as brânquias, sendo que a toxicidade do Pb está associada a um desequilíbrio osmótico e iônico em animais aquáticos. Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar *in vitro* a interferência deste metal sobre células branquiais de espécies de crustáceos com distintos padrões de osmorregulação. Para tanto, antes de analisar a interferência do metal foi realizada uma caracterização osmo-iônica de duas espécies (*Hepatus pudibundus* – marinha e *Callinectes ornatus* – marinha/estuarina) diante de diluição da água do mar. Os animais foram expostos à condição controle (33‰ 0,5h) e à água do mar diluída (25‰ 0,5h e 25‰ 8h), e após exposição foi retirada a hemolinfa para medida da osmolalidade e dosagem de íons ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Mg}^{++}$ ). Também foi retirada uma amostra do músculo da quela e as brânquias. No músculo e nas brânquias foram medidos o teor de hidratação e a concentração de NPS (substâncias positivas a ninidrina). Nas brânquias também foi medida a atividade das enzimas  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  (NaK), e Anidrase Carbônica (AC). Conforme esperado *H. pudibundus* osmoconforma quando em água diluída enquanto *C. ornatus* osmorregula. Ambas as espécies mantiveram a hidratação de seus tecidos sendo que o músculo de *H. pudibundus* utiliza a liberação de NPS para a manutenção da água tecidual. Não houve alteração na atividade da AC e a atividade da NaK diminuiu significativamente já em 0,5 h de exposição à água diluída em ambas as espécies. Os resultados indicam que os animais utilizam diferentes estratégias de regulação osmótica e iônica para lidar com a diminuição de salinidade, enquanto *H. pudibundus* depende mais de IIR (regulação isosmótica intracelular) para tolerar a diluição, *C. ornatus* tampona parcialmente a variação do meio extracelular através de AER (regulação anisosmótica extracelular), dependendo menos de IIR. Após a caracterização osmo-iônica, foram realizados os experimentos *in vitro* da toxicidade do Pb. Foi analisada a toxicidade de quatro concentrações de chumbo -  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  (1, 10, 20 e 40  $\mu\text{M}$ ) - sobre a viabilidade celular branquial em 3 diferentes tempos experimentais (1, 3 e 6 horas). Os resultados indicam que a toxicidade do Pb sobre as células branquiais é dose- e tempo- dependente, e que as células de *H. pudibundus* parecem ser mais sensíveis ao chumbo do que as células de *C. ornatus*. Além disso, foi analisada a capacidade das células branquiais de regular volume diante de hiposmotividade (choque hipo de 75 e 50%) e a influência do Pb sobre a manutenção de volume celular em condições isosmóticas (isosmotividade associada a duas concentrações de Pb – 10 e 40  $\mu\text{M}$ ). Sem a presença do Pb, as células branquiais de ambas as espécies são perfeitamente capazes de regulação de volume celular diante do choque hiposmótico 75%. Células branquiais de *C. ornatus* entretanto apresentaram um pequeno inchaço durante o choque hiposmótico de maior intensidade (50%), enquanto células de *H. pudibundus* ainda apresentaram capacidade de regulação de volume. Na presença de Pb, mesmo que sob isosmotividade, as células branquiais de ambas as espécies perderam volume. Células de *H. pudibundus* apresentaram cerca de 15% de redução de volume em ambas concentrações de Pb testadas (10 e 40  $\mu\text{M}$ ), células de *C. ornatus* foram menos sensíveis à concentração de 10  $\mu\text{M}$  e apresentaram cerca de 10% de redução de volume, enquanto na concentração de 40  $\mu\text{M}$  o volume perdido foi também de cerca de 15%. Esses resultados indicam que o Pb promove de alguma forma um desequilíbrio osmótico fazendo com que as células percam água. Quando o Pb 10  $\mu\text{M}$  foi associado ao choque hiposmótico de 75% e 50%, células de *C. ornatus* perderam ainda mais volume enquanto células de *H. pudibundus* se mostraram capazes de

regular volume celular. Foram então analisadas as possíveis vias de atuação do Pb sobre os mecanismos de regulação de volume celular através da utilização de inibidores dessas vias associados à isosmoticidade, à isosmoticidade + 10 $\mu$ MPb e à hiposmoticidade 75% + 10 $\mu$ MPb. Para inibir canais de Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase e aquaporinas foram utilizados: verapamil, ouabaína e cloreto de mercúrio, respectivamente. Os resultados indicam que as diferenças da influência do Pb encontradas na regulação de volume celular entre as duas espécies se referem ao padrão de regulação osmótica e iônica e grau de capacidade de regulação de volume que as espécies apresentam. *C. ornatus* parece ser mais suscetível a alterações de volume celular por influência do Pb devido à maior entrada do metal através de fluxos iônicos para a absorção de sal inerentemente presentes nas células branquiais, comuns a um organismo osmorregulador. Canais de Ca<sup>2+</sup> parecem ser via de entrada de Pb, e aquaporina parece ser alvo de toxicidade do Pb pelo menos em *H. pudibundus*. O Pb parece não interferir na atividade da NaK em nenhuma das espécies. Por fim foi realizada a identificação de um possível mecanismo de defesa branquial, o mecanismo MXR, assim como sua indução pelas 4 concentrações de Pb testadas. As brânquias de ambos os animais apresentam esse mecanismo que possui maior atividade nas concentrações mais baixas de Pb (1 e 10 $\mu$ M), e não existe indução do mecanismo nas concentrações mais altas (20 e 40 $\mu$ M). Nossos resultados indicam que os efeitos tóxicos do chumbo podem ser diferentes conforme a estratégia osmótica e iônica adotada por animais aquáticos e sugerem ainda que células de organismos osmorreguladores são mais suscetíveis à contaminação por metal do que células de organismos osmoconformadores, principalmente em situações de redução de salinidade.



## Abstract

The crustacean gills constitute a selective interface between the external and internal environment, and their location and function expose their cells to alterations in the aquatic environment such as, for example, salinity variations and presence of contaminants. Metals such as lead (Pb) have been reported in aquatic ecosystems at levels above the established by Brazilian legislation. Some studies indicate that decapod crustaceans accumulate metals in organs like gills, and lead toxicity is associated with an osmotic and ionic disequilibrium in aquatic animals. Therefore, the objective of this work was to evaluate *in vitro* the influence of this metal on gill cells of crustacean species with different patterns of osmoregulation. For this, before considering lead interference, an osmoionic characterization of two species (*Hepatus pudibundus*- marine and *Callinectes ornatus*- marine/estuarine) in face of sea water dilution was performed. Animals were exposed to control condition (33‰ 0.5h) and diluted sea water (25‰ 0.5h and 25‰ 8h). After the exposure haemolymph was sampled to measure osmolality and ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , K, and Mg. A fragment of chelipod muscle and the gills were also removed for quantitative evaluation of tissue hydration and the concentration of NPS (ninhydrin positive substances). In the gills  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  (NaK) and carbonic anhydrase (AC) activities were also measured. As expected, *H. pudibundus* osmoconforms when in diluted seawater and *C. ornatus* osmorregulates. Both species maintained the degree of hydration of their tissues, and *H. pudibundus* uses the release of NPS for tissue water maintenance. There was no change in CA activity and the activity of NaK has decreased significantly after 0.5 h of exposure to diluted seawater in both species. The results indicate that the animals use different strategies for osmotic and ionic regulation to deal with decreasing salinity, while *H. pudibundus* depends more on IIR (isosmotic intracellular regulation) to tolerate dilution, *Callinectes ornatus* partially buffers the extracellular fluid by AER (anisomotic extracellular regulation), depending less on IIR. After osmo-ionic characterization of both species, the *in vitro* experiment of Pb toxicity was performed. The toxicity of four lead concentrations was evaluated -  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  (1, 10, 20 and  $40\mu\text{M}$ ) - on gill cell viability in three different experimental times (1, 3 and 6 h). The results indicate that Pb toxicity on gill cells is dose- and time-dependent, and cells of *H. pudibundus* seem to be more sensitive to lead than the cells of *C. ornatus*. In addition, we analyzed the capacity of gill cells to regulate volume in hyposmotic conditions (hypo shock of 75 and 50%) and the influence of Pb on the maintenance of cell volume in isosmotic conditions (isosmotic associated with two concentrations of Pb - 10 and  $40\mu\text{M}$ ). Without the presence of Pb, gill cells of both species are quite capable of cell volume regulation in a 75% hyposmotic shock. Gill cells of *C. ornatus*, however, showed a small swelling during hyposmotic shock of greater intensity (50%), while cells of *H. pudibundus* still showed the ability of volume regulation. In the presence of Pb, even under isosmotic condition, the gill cells of both species lost volume. Cells of *H. pudibundus* showed about 15% of volume reduction in both tested Pb concentrations (10 and  $40\mu\text{M}$ ), cells of *C. ornatus* were less sensitive to the concentration of  $10\mu\text{M}$  and showed about 10% in volume reduction, while the concentration of  $40\mu\text{M}$  the volume lost was also about 15%. These results indicate that Pb somehow promotes an osmotic imbalance leading to the loss of cell water. When  $10\mu\text{M}$  Pb was associated with hyposmotic shock of 75% and 50%, cells of *C. ornatus* lost even more volume, while cells of *H. pudibundus* were able to regulate cell volume. We then analyzed the possible pathways of Pb action on the mechanisms of cell volume regulation by using inhibitors of these pathways linked to isosmoticity, isosmoticity plus  $10\mu\text{M}$  Pb, and 75% hyposmoticity plus  $10\mu\text{M}$  Pb. To inhibit  $\text{Ca}^{2+}$  channels,  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  and aquaporins were utilized: verapamil, ouabain and mercuric chloride, respectively. The results indicate that the differences of Pb influence found

in cell volume regulatory capacity between the two species refer to the pattern of osmotic and ionic regulation and the capacity of cell volume regulation displayed by the species. *C. ornatus* seems to be more susceptible to changes in cell volume by Pb influence due to higher inflow of metal through ionic fluxes for salt absorption, putatively present in gill cells, common to osmoregulators.  $\text{Ca}^{2+}$  channels seem to be the Pb inflow pathway, and aquaporin seems to be target of Pb toxicity at least in *H. pudibundus*. Pb does not appear to interfere in the NaK activity in either species. Finally, the possible role of a gill defense mechanism, the MXR mechanism, was also evaluated. Its induction by four Pb concentrations was tested. The gills of both animals indeed show this mechanism, that has higher activity in lower concentrations of Pb (1 and 10 $\mu\text{M}$ ), and there is no induction of mechanism in higher Pb concentrations (20 and 40 $\mu\text{M}$ ). Our results indicate that the toxic effects of lead may be different depending on osmotic and ionic strategy adopted by aquatic animals, and further suggest that osmoregulators are more susceptible to contamination by metal than osmoconformers, especially in situations of salinity reduction.

## Sumário

<b>Resumo .....</b>	<b>vi</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>viii</b>
<b>Lista de Figuras .....</b>	<b>xiii</b>
 <b>1 Introdução Geral .....</b>	 <b>16</b>
<b>1.1 Objetivos e organização da tese .....</b>	<b>25</b>
<b>1.2 Os animais.....</b>	<b>26</b>
 <b>Capítulo I: Caracterização da homeostase osmo-iônica diante de diluição da água do mar, em caranguejos marinhos (<i>Hepatus pudibundus</i> e <i>Callinectes ornatus</i>) com diferentes comportamentos osmorregulatórios .....</b>	 <b>28</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>29</b>
<b>1 Introdução .....</b>	<b>30</b>
<b>2 Objetivos .....</b>	<b>37</b>
<b>3 Material e Métodos .....</b>	<b>38</b>
3.1 Coleta e manutenção dos animais .....	38
3.1.1 Local de coleta.....	38
3.1.2 Manutenção dos animais.....	38
3.2 Caracterização das respostas dos animais aos choques osmóticos .....	39
3.2.1 Dosagem de íons e medida da osmolalidade da hemolinfa .....	40
3.2.2 Teor hídrico tecidual.....	40
3.2.3 Dosagem de NPS no tecido branquial e muscular.....	41
3.2.4 Atividade da anidrase carbônica.....	42
3.2.5 Atividade da Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> ATPase.....	43
3.2.6 Dosagem de proteínas totais .....	44
3.3 Análise Estatística .....	44
<b>4 Resultados.....</b>	<b>45</b>
4.1 Osmolalidade e concentração iônica da hemolinfa.....	45
4.2 Teor de hidratação do tecido branquial e muscular .....	48
4.3 Conteúdo de NPS no tecido branquial e muscular.....	50

4.4 Atividade da anidrase carbônica .....	51
4.5 Atividade da Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> ATPase .....	52
<b>5 Discussão e conclusões .....</b>	<b>54</b>

## **Capítulo II: Efeito tóxico do chumbo sobre a regulação de volume celular branquial em caranguejos com diferentes comportamentos osmorregulatórios ....65**

<b>Resumo .....</b>	<b>66</b>
<b>1 Introdução .....</b>	<b>67</b>
<b>2 Objetivos .....</b>	<b>73</b>
<b>3 Material e Métodos .....</b>	<b>74</b>
3.1 Coleta e manutenção dos animais .....	74
3.2 Preparo das soluções experimentais.....	74
3.2.1 Solução controle .....	74
3.2.2 Soluções Pb.....	74
3.3 Determinação da real concentração de chumbo nas soluções experimentais ....	75
3.4 Dissociação das células .....	75
3.4.1 Viabilidade celular.....	76
3.5 Análise da toxicidade do chumbo sobre as células branquiais .....	77
3.6 Análise da regulação de volume celular.....	77
3.7 Efeito do chumbo sobre a regulação de volume celular .....	80
3.8 Análise de possíveis vias envolvidas na regulação de volume celular .....	81
3.9 Análise estatística.....	81
<b>4 Resultados.....</b>	<b>83</b>
4.1 Concentração de chumbo dissolvido e total nas soluções experimentais .....	83
4.2 Análise da toxicidade do chumbo sobre as células branquiais .....	83
4.3 Análise da capacidade de regulação de volume celular diante de choques hiposmóticos .....	86
4.4 Efeito do chumbo sobre a regulação de volume celular .....	88
4.5 Análise das possíveis vias envolvidas na regulação de volume celular.....	96
4.6 A participação de aquaporinas na regulação de volume das células branquiais de <i>Hepatus pudibundus</i> e <i>Callinectes ornatus</i> .....	105
<b>5 Discussão e conclusões .....</b>	<b>111</b>

<b>Capítulo III: Efeito do chumbo sobre a expressão do fenótipo MXR em brânquias de caranguejos .....</b>	<b>124</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>125</b>
<b>1 Introdução .....</b>	<b>126</b>
<b>2 Objetivos .....</b>	<b>130</b>
<b>3 Material e Métodos .....</b>	<b>131</b>
3.1 Coleta e manutenção dos animais .....	131
3.2 Preparo das soluções experimentais.....	131
3.3 Identificação do fenótipo MXR .....	131
3.4 Efeito do chumbo sobre o fenótipo MXR .....	132
3.5 Análise estatística.....	133
<b>4 Resultados .....</b>	<b>134</b>
4.1 Identificação do fenótipo MXR .....	134
4.2 Efeito do chumbo sobre o fenótipo MXR .....	135
<b>5 Discussão e conclusões .....</b>	<b>138</b>
 <b>Conclusões e perspectivas .....</b>	<b>143</b>
<b>Referências Bibliográficas: .....</b>	<b>145</b>

## Lista de Figuras

### Introdução Geral

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática da morfologia e estrutura fina de uma filobrânquia posterior de um caranguejo .....	18
<b>Figura 2:</b> Modelo esquemático das possíveis vias de transporte iônico em células branquiais (ionócitos) de crustáceos .....	23
<b>Figura 3:</b> Fotografia de um exemplar de <i>Hepatus pudibundus</i> .....	26
<b>Figura 4:</b> Fotografia de um exemplar de <i>Callinectes ornatus</i> .....	27

### Capítulo I

<b>Figura 5:</b> Modelo do mecanismo de transporte para a absorção transbranquial de NaCl pelas brânquias crustáceos .....	33
<b>Figura 6:</b> Gráfico da osmolalidade medida na hemolinfa de <i>Hepatus pudibundus</i> e <i>Callinectes ornatus</i> após exposição às condições experimentais.....	46
<b>Figura 7:</b> Gráfico da concentração medida de íons $\text{Na}^+$ e $\text{Cl}^-$ na hemolinfa de <i>Hepatus pudibundus</i> e <i>Callinectes ornatus</i> após exposição às condições experimentais .....	47
<b>Figura 8:</b> Gráfico da concentração medida de íons $\text{K}^+$ e $\text{Mg}^{++}$ na hemolinfa de <i>Hepatus pudibundus</i> e <i>Callinectes ornatus</i> após exposição às condições experimentais .....	48
<b>Figura 9:</b> Gráfico do teor de hidratação das brânquias e músculo de <i>Hepatus pudibundus</i> e <i>Callinectes ornatus</i> após exposição às condições experimentais.....	49
<b>Figura 10:</b> Gráfico do teor de NPS nas brânquias e músculo de <i>Hepatus pudibundus</i> e <i>Callinectes ornatus</i> após exposição às condições experimentais.....	51
<b>Figura 11:</b> Gráfico da atividade da enzima anidrase carbônica nas brânquias de <i>Hepatus pudibundus</i> e <i>Callinectes ornatus</i> após exposição às condições experimentais .....	52
<b>Figura 12:</b> Gráfico da atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ nas brânquias de <i>Hepatus pudibundus</i> e <i>Callinectes ornatus</i> após exposição às condições experimentais.....	53

### Capítulo II

<b>Figura 13:</b> Esquema representativo da regulação de volume celular, através de perda ou acúmulo de eletrólitos.....	68
<b>Figura 14:</b> Modelo esquemático da liberação e acúmulo de osmólitos orgânicos durante o processo de regulação de volume celular .....	69

<b>Figura 15:</b> Gráfico representativo da emissão de fluorescência pelas células branquiais de ambas as espécies durante o período de incubação com calceína-AM .....	79
<b>Figura 16:</b> Gráfico representativo de manutenção de volume relativo de células branquiais de ambas as espécies durante 5 minutos em solução salina isosmótica imediatamente após o período de incubação com calceína-AM .....	80
<b>Figura 17:</b> Gráfico da viabilidade das células branquiais de <i>Hepatus pudibundus</i> e <i>Callinectes ornatus</i> após exposição ao chumbo. ....	85
<b>Figura 18:</b> Gráfico da variação temporal do volume de células branquiais de <i>Hepatus pudibundus</i> e <i>Callinectes ornatus</i> quando expostas a choques osmóticos de diferentes intensidades (75 e 50% do controle isosmótico). ....	87
<b>Figura 19:</b> Gráfico da variação temporal do volume de células branquiais de <i>Hepatus pudibundus</i> e <i>Callinectes ornatus</i> quando expostas a duas concentrações de nitrato de chumbo (10 e 40µM). ....	90
<b>Figura 20:</b> Gráfico da variação temporal do volume de células branquiais de <i>Hepatus pudibundus</i> e <i>Callinectes ornatus</i> quando expostas a concentração de 10µM de nitrato de chumbo associada ao choque hiposmótico de 75%. ....	92
<b>Figura 21:</b> Gráfico da variação temporal do volume de células branquiais de <i>Hepatus pudibundus</i> e <i>Callinectes ornatus</i> quando expostas a concentração de 10µM de nitrato de chumbo associada ao choque hiposmótico de 50%. ....	94
<b>Figura 22:</b> Gráfico resumo da variação temporal do volume de células branquiais de <i>Hepatus pudibundus</i> e <i>Callinectes ornatus</i> quando expostas a concentração de 10µM de nitrato de chumbo sob isosmoticidade e associada ao choques hiposmóticos de 75 e 50%. ....	95
<b>Figura 23:</b> Variação temporal do volume de células branquiais de <i>Hepatus pudibundus</i> e <i>Callinectes ornatus</i> em condição isosmótica associada ao verapamil .....	97
<b>Figura 24:</b> Variação temporal do volume de células branquiais de <i>Hepatus pudibundus</i> e <i>Callinectes ornatus</i> em condição isosmótica associada à ouabaína .....	98
<b>Figura 25:</b> Variação temporal do volume de células branquiais de <i>Hepatus pudibundus</i> e <i>Callinectes ornatus</i> durante exposição ao chumbo associado ao verapamil .....	100
<b>Figura 26:</b> Variação temporal do volume de células branquiais de <i>Hepatus pudibundus</i> e <i>Callinectes ornatus</i> durante exposição ao chumbo associado à ouabaína .....	101
<b>Figura 27:</b> Variação temporal do volume de células branquiais de <i>Hepatus pudibundus</i> e <i>Callinectes ornatus</i> durante exposição ao chumbo associado a um choque hiposmótico e na presença de verapamil .....	103
<b>Figura 28:</b> Variação temporal do volume de células branquiais de <i>Hepatus pudibundus</i> e <i>Callinectes ornatus</i> durante exposição ao chumbo associado a um choque hiposmótico e na presença de ouabaína .....	104

<b>Figura 29:</b> Variação temporal do volume de células branquiais de <i>Hepatus pudibundus</i> e <i>Callinectes ornatus</i> em condição isosmótica associada ao $\text{HgCl}_2$ .....	106
<b>Figura 30:</b> Variação temporal do volume de células branquiais de <i>Hepatus pudibundus</i> e <i>Callinectes ornatus</i> durante exposição ao chumbo associado ao $\text{HgCl}_2$ .....	107
<b>Figura 31:</b> Variação temporal do volume de células branquiais de <i>Hepatus pudibundus</i> e <i>Callinectes ornatus</i> durante exposição ao chumbo associado a um choque hiposmótico e na presença de $\text{HgCl}_2$ .....	108
<b>Figura 32:</b> Resumo da variação de volume encontrada após 20 minutos de exposição das células branquiais de <i>Hepatus pudibundus</i> às condições experimentais. (A) condições isosmóticas e (B) condições hiposmóticas .....	109
<b>Figura 33:</b> Resumo da variação de volume encontrada após 20 minutos de exposição das células branquiais de <i>Callinectes ornaus</i> às condições experimentais. (A) condições isosmóticas e (B) condições hiposmóticas .....	110

### Capítulo III

<b>Figura 34:</b> Gráfico da identificação do fenótipo MXR no tecido branquial de <i>Hepatus pudibundus</i> e <i>Callinectes ornatus</i> através de inibição por verapamil ( $25\mu\text{M}$ ).....	135
<b>Figura 35:</b> Gráfico do mecanismo MXR no tecido branquial de <i>Hepatus pudibundus</i> e <i>Callinectes ornatus</i> induzido após exposição ao chumbo .....	137



## INTRODUÇÃO GERAL

As brânquias de animais aquáticos são consideradas como um órgão fundamental para manutenção da homeostase do meio extracelular, de modo que as principais funções homeostáticas estão localizadas no tecido branquial. O tecido branquial constitui uma interface seletiva entre o ambiente externo e o meio interno, se apresentando como um órgão multifuncional que atua nas trocas gasosas, no transporte de osmólitos e osmorregulação, na excreção de nitrogênio e regulação do equilíbrio ácido-base (Péqueux, 1995; Lucu e Towle, 2003; Freire *et al*, 2008a).

Todos os crustáceos decápodos possuem brânquias, com exceção de camarões planctônicos do gênero *Lucifer* (Família Luciferidae; Super-família Sergestoidea) (Felgenhauer, 1992), mas a disposição e o número de brânquias variam muito de espécie para espécie. As brânquias de crustáceos decápodos se encontram dentro de uma câmara branquial que está localizada ventrolateralmente no corpo do animal. As brânquias estão fixadas perto da base dos apêndices torácicos (3 pares de maxilípedes e 5 pares de pereópodos) e no máximo 4 brânquias podem estar associada a cada um desses membros. Entretanto, o número teórico máximo de 32 brânquias de cada lado do corpo do animal nunca está presente (Revisão em Taylor e Taylor, 1992).

Conforme sua localização precisa as brânquias podem ainda ser denominadas pleurobrânquias, quando fixadas na parede do corpo acima dos apêndices, artrobrânquias, se fixadas logo acima da junção do apêndice com o corpo, ou ainda podobrânquias se fixadas ao apêndice através da coxa do epipodito (Barnes e Harrison, 1992). O arranjo das brânquias nos somitos torácicos segundo essa classificação é chamado de fórmula branquial. Entretanto,

essa classificação é apenas anatômica, não indicando diferença morfológica ou fisiológica entre as brânquias.

Entre os membros da ordem dos decápodos, existem 3 tipos morfolologicamente distintos de brânquias, as dendrobrânquias, as tricobrânquias e as filobrânquias. As filobrânquias são encontradas em caranguejos braquiúros, alguns anomuros e em camarões carídeos. Esse tipo de brânquia compreende um vaso aferente dorsal e um (ou dois) eferente ventral ligados a uma série de lamelas achatadas (Freire *et al*, 2008a). As lamelas das filobrânquias são mais largas na base da brânquia tornando-se progressivamente menores na extremidade que acaba na parte mediana do animal. Cada uma dessas lamelas é formada por uma camada única de epitélio coberta pela cutícula. O espaço da hemolinfa entre duas camadas de epitélio contém um septo intralamelar, mecanicamente sustentado pelas células pilares, criando dois compartimentos dentro da lamela (Freire *et al*, 2008a). Dessa forma, a hemolinfa flui entre os dois compartimentos no sentido do canal aferente para o canal eferente (ver Figura 1).

Em animais osmorreguladores existem diferenças morfológicas e fisiológicas entre as brânquias espacialmente distribuídas na câmara branquial. Virtualmente elas são separadas em dois grupos: brânquias anteriores e brânquias posteriores. As brânquias de crustáceos apresentam uma cutícula quitinosa em sua superfície e essa cutícula pode variar muito em espessura, dependendo se as brânquias são anteriores ou posteriores na câmara branquial. Nas anteriores, cuja função é respiratória, a cutícula é mais fina do que nas posteriores que possuem função de regulação iônica (Freire *et al*, 2008a). Além da cutícula, outras diferenças morfológicas podem ser vistas entre brânquias anteriores e posteriores. Um epitélio bem mais espesso é encontrado em áreas envolvidas com regulação iônica se comparado a regiões cuja função é puramente respiração. Também, as áreas envolvidas com transporte iônico apresentam extensivos dobramentos na membrana plasmática, com folhetos apicais

(microvilos) onde se inserem transportadores e abundância de mitocôndrias (Taylor e Taylor, 1992; Freire *et al*, 2008a).

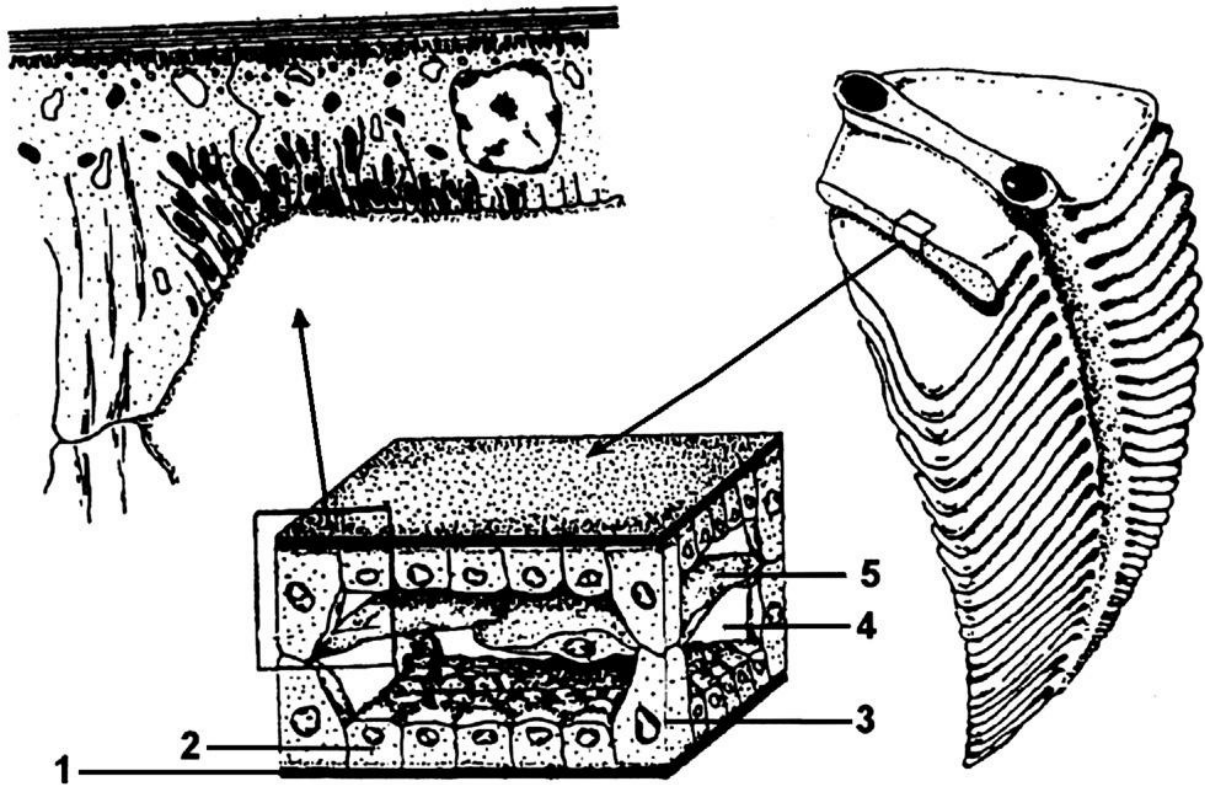


Figura 1: Representação esquemática da morfologia e estrutura fina de uma filobrânquia posterior de um caranguejo. 1 cutícula; 2 célula espessa ou ionócito; 3 célula pilar; 4 espaço da hemolinfa; 5 septo intralamelar. Retirado de Freire e colaboradores (2008a) e baseado em estudos de microscopia em *Uca* spp. (Onken e Riestenpatt, 1998).

O epitélio branquial de crustáceos decápodes apresenta pelo menos 5 tipos de células, embora essas possam receber nomes diferentes conforme o autor (Goodman e Cavey, 1990; Felgenhauer, 1992; Taylor e Taylor, 1992; Freire *et al*, 2008a). O epitélio é composto por células principais ou células delgadas, cuja função é respiratória; células estriadas também chamadas de células espessas ou ainda de ionócitos que muito provavelmente estão envolvidas na ionoregulação; além de células pilares para a sustentação da lamela. Segundo alguns autores, nefrócitos e glicócitos completam a lista (Goodman e Cavey, 1990;

Felgenhauer, 1992), e segundo outros células “flange” e células atenuadas compõem os 5 tipos celulares (Taylor e Taylor, 1992; Freire *et al.*, 2008a).

É fato que a função e localização das brânquias expõem suas células a alterações do ambiente aquático, como por exemplo, variações de salinidade e presença de contaminantes. Desse modo, além das células branquiais terem de lidar com alterações de salinidade que ocorrem naturalmente em ambientes estuarinos, também estão expostas a uma grande variedade de contaminantes presentes no ambiente aquático fruto da ação antrópica.

O crescente processo de industrialização tem contribuído de forma contínua para o comprometimento dos ecossistemas terrestres. Diferentes contaminantes são freqüentemente lançados nos diversos ambientes incluindo os corpos d’água, solo e ar, e trazendo grandes prejuízos para a biota aquática. Os metais constituem uma classe de contaminante que gera uma enorme preocupação pelas suas características de contaminação ambiental, metais não são transformados pelos organismos (como acontece com compostos orgânicos) e possuem capacidade de bioacumulação. Muitos metais exercem função essencial no metabolismo celular como, por exemplo, o cobre e o zinco, entretanto dependendo da concentração no ambiente todos os metais tem potencial para causar efeitos ecotoxicológicos (Golovanova, 2008).

De forma natural, processos geoquímicos levam à incorporação de metais nos sistemas aquáticos, mas a urbanização e industrialização têm contribuído para o maior aporte desses agentes químicos nestes ambientes (Santore *et al.*, 2000). Um desses metais é o chumbo (Pb) que é constituinte natural de algumas rochas, como por exemplo a galena, na forma de sulfeto de chumbo. Na natureza, sem ação antrópica, o chumbo raramente é encontrado como metal, normalmente está associado a outros elementos para formar os compostos de chumbo (PHS, 2005).

Compostos de chumbo são largamente utilizados na fabricação de baterias de carros e outros veículos, além de serem encontrados em pigmentos de tintas, corantes e esmalte de cerâmicas. Estes compostos também eram utilizados na composição de gasolinas automotivas, o composto chumbo tetraetila (CTE) foi durante muitos anos incorporado à gasolina de vários países para aumentar a sua octanagem. O Brasil, em 1989, foi um dos primeiros países a retirar o chumbo de suas gasolinas automotivas. Entretanto, o chumbo ainda é utilizado na gasolina de aviação (PETROBRÁS, 2006).

Metais como o chumbo podem atingir os corpos d'água através do despejo de rejeitos industriais e domésticos, ou ainda pela chuva ácida sobre o solo liberando metais no ambiente aquático. Os níveis de chumbo no ambiente têm aumentado mais de 1000 vezes nos últimos três séculos, como resultado da atividade humana. O maior aumento ocorreu no último século, entre os anos 1950 e 2000, refletindo em grande parte o aumento do uso mundial de chumbo como componente da gasolina. (PHS, 2005).

A legislação brasileira, segundo a resolução 357 do CONAMA de 17 de março de 2005 que dispõe sobre a classificação dos corpos de água, estabelece como limite máximo para a proteção das comunidades aquáticas 10 µg/L de chumbo total, tanto em água doce, como em águas salinas e salobras. Em águas superficiais a concentração natural do metal é em torno de 0,02 µg/L (WHO, 1996). Entretanto, metais como o chumbo têm sido registrados em ecossistemas aquáticos em níveis acima do estabelecido pela legislação brasileira (Mahiques *et al*, 2009; IAP, 2009).

O impacto de metais sobre a fauna aquática pode ser avaliado através de testes de toxicidade, que possibilitam a determinação dos limites aceitáveis para diferentes substâncias. Dentre os efeitos subletais analisados, as respostas fisiológicas têm recebido alguma atenção recentemente. Estudos fisiológicos têm sido desenvolvidos para melhor entender a interação

dos metais com os organismos aquáticos (Bianchini *et al*, 2002; Grosell *et al*, 2002; Brooks e Mills, 2003; Grosell *et al*, 2004; Bianchini *et al*, 2005), e alguns estudos claramente indicam que crustáceos decápodos acumulam metais, em níveis detectáveis, em órgãos como brânquias, gônadas, hepatopâncreas e músculo (Ahern e Morris, 1998; Al-Mohanna e Subrahmanyam, 2001).

Sabe-se também que alguns metais perturbam o equilíbrio osmótico e iônico de crustáceos, como o efeito de cobre sobre a regulação iônica do caranguejo *Carcinus maenas* (Hansen *et al*, 1992) ou do anfípode *Gammarus pulex* (Brooks e Mills, 2003), assim como o efeito de chumbo na regulação osmo-iônica do caranguejo vermelho *Dilocarcinus pagei* (Amado *et al*, 2006), ou ainda o efeito de cádmio na capacidade hiper-osmorregulatória do caranguejo chinês *Eriocheir sinensis* (Silvestre *et al*, 2005) e na regulação iônica e atividade da anidrase carbônica no caranguejo *Chasmagnathus granulata* (Vitale *et al*, 1999).

O epitélio branquial é o primeiro órgão a ter contato com os metais presentes na água, servindo, portanto, de via de entrada para estes e também de alvo para sua toxicidade. Como já mencionado anteriormente, a superfície corporal dos crustáceos é coberta por uma cutícula secretada pelas células do epitélio. Essa cutícula é primariamente permeável, a não ser em locais onde ocorre calcificação. Nas brânquias, a cutícula é portanto permeável e não oferece uma barreira significativa para evitar a entrada de metais. Entretanto, é na membrana celular do epitélio abaixo da cutícula que ocorre a entrada do metal para dentro do corpo do animal. (Rainbow, 1997). Várias possíveis rotas de entrada têm sido propostas, basicamente essas rotas envolvem o metal se ligar a proteínas da membrana celular e serem transportados passivamente através de difusão facilitada, ou ativamente através de uma ATPase. Em crustáceos, metais como o chumbo podem entrar na célula se ligando a um carreador específico para metais essenciais, ou ainda através de vias de tomada dos principais íons (Rainbow 1997).

Metais do grupo IA e IIA como o  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$  são rotineiramente transportados através da membrana por transportadores em sistemas bem definidos que requerem energia para a criação de gradientes de tomada dos íons, como é o caso da  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ , da  $\text{Ca}^{2+}\text{ATPase}$  ou ainda da interação da anidrase carbônica com a  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  (Lucu e Towle, 2003; Freire *et al*, 2008a) (Figura 2). Metais traço podem, entretanto, ser incorporados nesses sistemas, particularmente se eles são do tamanho iônico similar ao eletrólito que está sendo transportado. O íon  $\text{Cd}^{2+}$  possui um raio iônico (0,9Å) muito próximo ao do  $\text{Ca}^{2+}$  (0,99Å) e pode entrar na célula via canais de cálcio. Íons de manganês ( $\text{Mn}^{2+}$ ), assim como chumbo ( $\text{Pb}^{2+}$ , 1,19Å) também podem passar por esses canais, embora essa não seja a única rota de entrada desses metais (Rainbow 1995, Rainbow 1997).

Metais traço podem ainda entrar na célula passivamente, transportados por sistemas carreadores na membrana apical. Acredita-se que existam canais específicos para cada um dos metais essenciais, mas existe um potencial para qualquer íon metálico entrar na célula via outros canais de acordo com as características dos mesmos, o tamanho do metal considerando se está hidratado ou desidratado, o custo de desidratação, etc. Muitos metais traço possuem alta afinidade por sítios de ligação  $\text{S}^-$  e  $\text{N}^-$  das proteínas, assim ao entrar na célula a favor de um gradiente de concentração, se ligam a grandes moléculas de proteínas não-difusivas, de modo que o transporte continua sendo realizado passivamente, mesmo com uma alta concentração intracelular do metal (Rainbow 1997, Hebel *et al*, 1997).

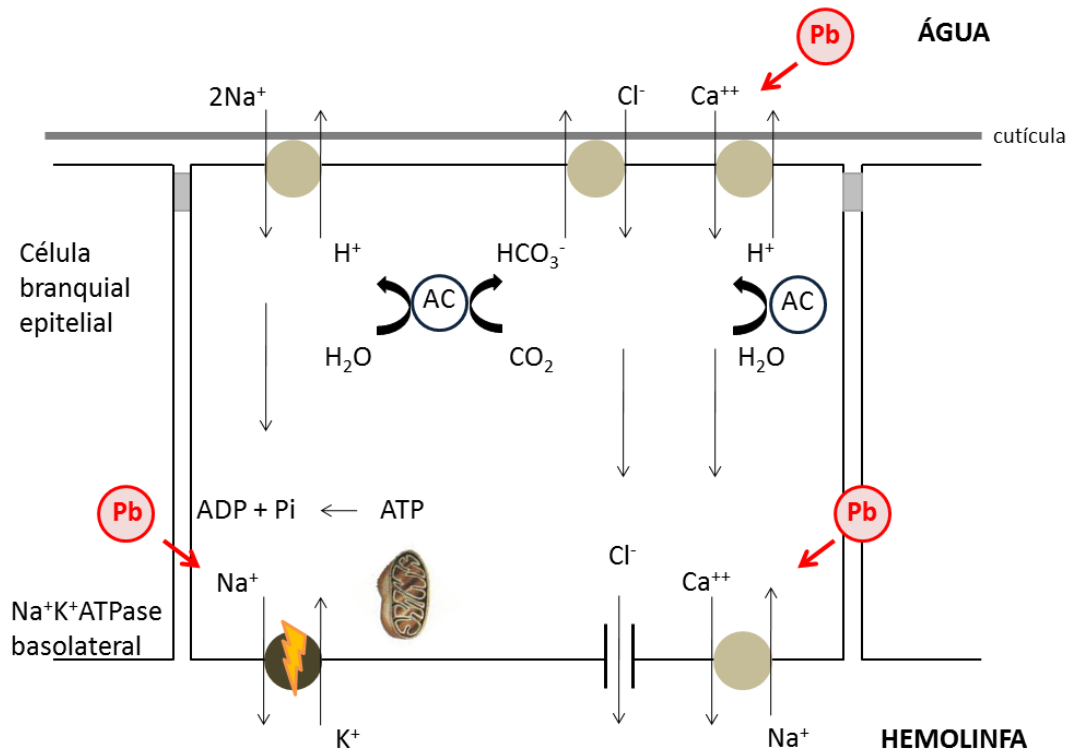


Figura 2: Modelo esquemático das possíveis vias de transporte iônico em células branquiais (ionócitos) de crustáceos. Reproduzido de [Rainbow \(1995\)](#).

Geralmente é considerado que a forma biodisponível da maioria dos metais é seu íon livre. É o íon metálico não complexado, embora hidratado, que possui as características físico-químicas apropriadas para entrar pela abertura de um canal iônico, sofrer desidratação, passar através do canal e reidratar após a passagem ([Rainbow 1995; Rainbow, 1997](#)). Assim, alguns modelos foram desenvolvidos para prever a toxicidade de metais a organismos aquáticos, os chamados modelos do ligante biótico (BLMs). Esses modelos assumem que a quantidade de metal que se liga a uma membrana biológica, como a das brânquias, determina a toxicidade aguda do metal. A competição catiônica no sítio de ligação na membrana (com o  $\text{Ca}^{2+}$  por exemplo) e a complexação aniônica na água (com matéria orgânica natural, carbonato, cloreto, etc.) diminui a ligação do metal à membrana, diminuindo portanto, sua toxicidade ([Playle, 2004](#)).



Após a entrada do metal nas células, existem alguns mecanismos de defesa conhecidos como, por exemplo, a síntese de metalotioneínas que desencadeia um processo de detoxificação celular uma vez que essas proteínas se ligam fortemente aos metais e são eliminadas pelo sistema lisossomal (Hebel *et al*, 1997; Ahearn *et al*, 2004). Entretanto há alguns anos têm-se especulado que vários organismos são capazes de viver em ambientes com altos níveis de xenobióticos, ativando e aumentando a expressão de proteínas com fenótipo de resistência a multixenobióticos (MXR). Uma destas proteínas, a glicoproteína P (P-gp) transmembrana, previne as células de acumularem xenobióticos (Kurelec *et al*, 2000).

Proteínas como a P-gp têm sido descritas em diferentes animais aquáticos (Bard, 2000; Smital *et al*, 2000; Hamdoun *et al*, 2002; Shúilleabháin *et al*, 2005; Žaja *et al*, 2006; Moreau *et al*, 2008; Zhou *et al*, 2009). No entanto, a indução de P-gp para extrusão de xenobióticos por células de crustáceos sob ação de contaminantes ainda é pouco estudada (Timofeyev *et al* 2007). Raros também são os estudos sobre a interação da P-gp com metais, mas sabe-se que metais como cádmio e zinco induzem a expressão da P-gp nas brânquias do molusco *Corbicula fluminea* (Achard *et al*, 2004). Ou ainda que a exposição ao cádmio aumenta a atividade e a expressão da P-gp em brânquias e hepatopâncreas da ostra *Crassostrea virginica* (Ivanina e Sokolova, 2008).

A complexa estrutura tridimensional das brânquias pode ser a maior barreira para estudar o mecanismo celular envolvido em suas funções fisiológicas (Leguen *et al*, 1998; Wood *et al*, 2002). A facilidade da abordagem *in vitro* já tornou possível descrever algumas funções celulares, como a capacidade dessas células de regular o equilíbrio ácido-base intracelular assim como os mecanismos de transporte passivo e ativo envolvidos na regulação de volume celular (Wood *et al*, 1998; Leguen *et al*, 2001; Leguen e Prunet, 2004). Também possibilitou o estudo do efeito de diversos xenobióticos, inclusive metais pesados, nas funções dessas células (Sandbacka *et al*, 1999; Leguen *et al*, 2001; Leguen e Prunet 2001).

Portanto, estudos toxicológicos com células isoladas podem identificar mecanismos moleculares e celulares pelos quais os contaminantes levam aos efeitos tóxicos sub-letais, tendo a vantagem de se poder comparar com experimentos *in vivo*, utilizando menos amostra e gerando menos material tóxico a ser descartado (Leguen *et al*, 2001).

Entretanto, as análises *in vitro* necessitam de validação e padronização, para que sejam utilizadas em preferência à experimentação *in vivo* (Zucco *et al*, 2004). Por exemplo, Leguen e Prunet (2001) submeteram células branquiais de peixes em cultura a choque hiposmótico e utilizaram mecanismos da regulação de volume celular para avaliar efeito de diferentes xenobióticos. Os efeitos observados pelos autores foram consistentes com as propriedades tóxicas descritas para os xenobióticos testados, validando assim, nesse caso, a utilização de culturas primárias para estudo de toxicidade em células de peixes.

### 1.1 Objetivos e organização da tese

Considerando-se que a toxicidade do chumbo, assim como de outros metais, está associada a um desequilíbrio osmótico e iônico em animais aquáticos, avaliar a interferência deste metal sobre células-alvo de espécies com diferentes padrões de osmorregulação é muito relevante para o conhecimento da sua toxicidade celular. Desta forma, o objetivo da tese foi estudar a interferência da contaminação por metal na homeostasia hídrica e eletrolítica de células branquiais de 2 espécies de crustáceos decápodes com distintos padrões de regulação osmótica e iônica extracelular. *Hepatus pudibundus* foi escolhido por ser marinho e osmoconformador, e *Callinectes ornatus* por habitar ambientes estuarinos e ser osmorregulador.

Apesar da toxicidade do chumbo em uma abordagem *in vitro* ser o principal objetivo da tese, houve a necessidade de caracterizar melhor aspectos da fisiologia branquial desses animais sem a interferência do metal. A tese foi então dividida em 3 capítulos.

O capítulo I refere-se a uma caracterização *in vivo* da homeostase osmo-iônica dos animais diante de uma situação de diluição da água do mar. No capítulo II e III foi discutida a interferência *in vitro* do metal, associado ou não a alterações de osmolalidade, nos processos fisiológicos das células branquiais de ambas as espécies. No capítulo II foi explorada a capacidade de regulação de volume das células brânquias de ambas as espécies diante de hiposmotividade, contaminação por chumbo, ou então diante de hiposmotividade associada ao chumbo. Também foram investigadas possíveis vias que participam da regulação de volume celular e a atuação do chumbo sobre elas. No capítulo III foi verificada a expressão do fenótipo MXR como possível mecanismo de defesa diante de contaminação por chumbo. Em todos os capítulos foi utilizada uma abordagem comparativa entre as duas espécies.

## 1.2 Os Animais



Figura 3: Exemplar de *Hepatus pudibundus* (Herbst, 1785). Imagem obtida em [www.jamarc.fra.affrc.go.jp](http://www.jamarc.fra.affrc.go.jp)

*Hepatus pudibundus* é um caranguejo marinho pertencente à Infra-Ordem Brachyura, Super-Família Calappoidea, Família Calappidae, Sub-Família Matutinae. Sua distribuição ocorre no Atlântico ocidental da América Central à América do Sul; no Brasil é encontrado do Amapá ao Rio Grande do Sul. Também é encontrado no Atlântico oriental, costa oeste africana. São animais que habitam, preferencialmente, fundos lamosos, arenosos e de conchas, de águas muito rasas até 160 metros (Melo, 1996).



Figura 4: Exemplar de *Callinectes ornatus* (Ordway, 1863). Imagem obtida em [www.corvand.net](http://www.corvand.net)

*Callinectes ornatus* é um siri marinho/estuarino pertencente à Infra-Ordem Brachyura, Super-Família Portunoidea, Família Portunidae, Sub-Família Portuninae. Sua distribuição geográfica se dá no Atlântico Ocidental; da Carolina do Norte até a Florida, no golfo do México, Antilhas, Colômbia, Venezuela, Guiana e no Brasil (do Amapá ao Rio Grande do Sul). Ocorrem em fundos de areia e lama e em águas menos salinas, podendo alcançar 75 metros de profundidade (Melo, 1996).

**Caracterização da homeostase osmo-iônica diante de diluição da água do mar, em caranguejos marinhos (*Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus*) com diferentes comportamentos osmorregulatórios.**

## **Capítulo I**

## RESUMO

Crustáceos marinhos quando submetidos a uma alteração de salinidade podem apresentar todos os tipos de estratégias osmorregulatórias, podendo ser desde osmoconformadores até osmorreguladores, e alguns inclusive podem passar de um padrão osmorregulador para osmoconformador dependendo da salinidade a que são submetidos. *Hepatus pudibundus* é um caranguejo marinho e *Callinectes ornatus* um siri marinho/estuarino. O objetivo desse capítulo foi realizar uma caracterização osmo-iônica das duas espécies diante de diluição da água do mar, a fim de caracterizar as estratégias osmorregulatórias empregadas. Os animais foram então expostos à condição controle (33‰ 0,5h) e à água do mar diluída (25‰ 0,5h e 25‰ 8h), e após a exposição foi retirada a hemolinfa para medida da osmolalidade e dosagem de íons ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Mg}^{++}$ ). Também foi retirado um pedaço de músculo da quela e as brânquias posteriores. No músculo e nas brânquias foram dosados o teor de hidratação e a concentração de NPS (substâncias positivas a ninidrina). Nas brânquias também foi medida a atividade das enzimas  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  (NaK), e anidrase carbônica (AC). *Hepatus pudibundus* osmoconforma quando em água diluída enquanto *Callinectes ornatus* osmorregula. Os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  foram diluídos na hemolinfa de *Hepatus pudibundus* enquanto *Callinectes ornatus* foi capaz de manutenção dos íons  $\text{Cl}^-$ . Ambas as espécies mantiveram a hidratação de seus tecidos (brânquias e músculo) sendo que o músculo de *Hepatus pudibundus* utiliza a liberação de NPS para a manutenção de água tecidual. Não foi encontrada diferença na atividade da AC nas brânquias de ambas as espécies e a atividade da NaK diminuiu significativamente já em 0,5 h de exposição em ambas as espécies. Esses resultados sugerem que a manutenção da concentração osmótica da hemolinfa de *Callinectes ornatus* está condicionada a tomada de eletrólitos por outras vias que não a AC e a NaK. Através desses resultados foi possível concluir que as espécies toleram a diminuição de salinidade por estratégias opostas. *Callinectes ornatus* utiliza regulação anisomótica extracelular, enquanto *Hepatus pudibundus* utiliza regulação isomótica intracelular.

## 1 INTRODUÇÃO

Crustáceos marinhos, se comparados a outros invertebrados marinhos, são incomuns quando submetidos a uma alteração de salinidade pela variedade de estratégias que podem ser adotadas em resposta à variação de salinidade do meio ambiente. Segundo [Péqueux \(1995\)](#) os crustáceos apresentam todos os tipos de estratégias osmorregulatórias. Quanto à capacidade de regular seus fluidos internos, eles podem ser desde osmoconformadores até osmorreguladores. Alguns podem passar de um padrão osmorregulador para um osmoconformador dependendo da salinidade à qual eles são submetidos, como o lagostim *Pacifastacus leniusculus* ([Wheatly e Henry, 1987](#)). Existem ainda crustáceos como o carídeo *Crangon crangon* que são fortes hiper e hiporreguladores, osmorregulando desde a água doce até a água do mar ([Mantel e Farmer, 1983](#)).

A estratégia de osmorregular consiste na manutenção da concentração osmótica do fluido extracelular diferente da concentração osmótica do meio externo, como acontece com animais de água doce que mantêm a concentração osmótica extracelular alta em relação à água circundante. Também, quando um animal osmorregulador se depara com uma alteração na concentração osmótica do meio externo, mecanismos de transporte iônico são ativados principalmente nas brânquias, de forma que a tomada ou a liberação de osmólitos mantém a concentração osmótica do fluido extracelular constante, independente da variação de osmolalidade externa. Esse tipo de regulação é conhecida como regulação anisosmótica extracelular (AER) ([Florkin 1962](#); [Foster et al, 2010](#)).

Contrariamente, um animal osmoconformador não possui essa capacidade de AER. Quando um animal osmoconformador se depara com uma alteração na concentração osmótica do ambiente externo, o fluido extracelular desse animal se iguala à concentração osmótica do

meio externo, através do movimento de água impulsionado por osmose, e também de íons. Assim, o meio extracelular desse animal varia conforme a alteração de osmolalidade do meio externo. As células desses animais são, portanto, expostas às variações de osmolalidade e devem realizar regulação de volume celular para a manutenção de suas funções vitais. Esse mecanismo de regulação é chamado de regulação isosmótica intracelular (IIR). A capacidade de IIR de um animal osmoconformador é o que determina o grau de tolerância desse animal às variações de salinidade do ambiente (Florkin 1962; Péqueux 1995; Freire *et al*, 2008b, Foster *et al*, 2010).

De maneira a superar as flutuações osmóticas durante a aclimação à salinidade, o epitélio branquial de espécies osmorreguladoras contém ferramentas bioquímicas para regular a concentração iônica da hemolinfa. A capacidade de transporte iônico que permite que crustáceos osmorreguladores mantenham a concentração osmótica de seus fluídos internos constante apesar de variações de salinidade depende da ativação de proteínas relacionadas com transporte iônico presentes na membrana celular em órgãos como as brânquias. A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase e a anidrase carbônica têm sido as mais frequentemente estudadas. Esses dois tipos de proteínas são conhecidas por atuarem na tomada de sal. Enquanto a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase proporciona uma força dirigida para a tomada de íons, a anidrase carbônica fornece substrato para trocadores que realizam a tomada de NaCl através das brânquias de caranguejos eurihalinos (Péqueux, 1995; Henry, 2001; Lucu e Towle, 2003).

A enzima anidrase carbônica catalisa a hidratação reversível de  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  em  $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{H}^+$  e está presente em quase todos os organismos vivos. Em crustáceos decápodos, a anidrase carbônica tem sido envolvida em todas as mais importantes funções das brânquias, como excreção de  $\text{CO}_2$ , balanço ácido-base e ionorregulação (Henry, 1988; Bottcher e Siebers, 1993; Bottcher *et al*, 1995).



Em crustáceos eurihalinos, a atividade da anidrase carbônica branquial tem sido reportada como fortemente dependente da salinidade ambiental (López Mañanes, *et al*, 2000; Henry *et al*, 2003; Genovese *et al*, 2005). De acordo com Henry (1988) a anidrase carbônica branquial citosólica está envolvida na troca iônica (tomada de NaCl através dos trocadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ,  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ), enquanto uma menor porção de anidrase carbônica associada à membrana celular facilita a excreção de  $\text{CO}_2$ . O mecanismo de absorção de NaCl em que a anidrase carbônica citosólica está envolvida é especialmente importante em crustáceos hiperreguladores (como os de água doce) que devem manter a concentração osmótica do seu meio extracelular bem acima da concentração osmótica da água circundante.

A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase é uma proteína de transporte presente na membrana plasmática de todas as células animais, e que em cada ciclo de atividade exporta  $\text{Na}^+$  do citosol para o meio extracelular e simultaneamente importa  $\text{K}^+$  para dentro da célula, as custas de hidrólise de ATP. O gradiente eletroquímico gerado por essa ATPase é fundamental para a manutenção do equilíbrio osmótico e iônico das células, assim como manutenção do potencial de repouso da membrana.

Em células branquiais, a localização basolateral da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase permite a extrusão ativa de íons  $\text{Na}^+$  da célula branquial para a hemolinfa. Assim, um aumento da atividade dessa enzima pode levar a um acúmulo de íons  $\text{Na}^+$  na hemolinfa do animal. Portanto, em células branquiais de crustáceos, a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase reflete a capacidade de osmorregulação. Essa enzima é considerada a força motriz para o transporte iônico, em parte pelo estabelecimento de um gradiente eletroquímico entre as membranas da célula epitelial (Lucu e Towle, 2003).

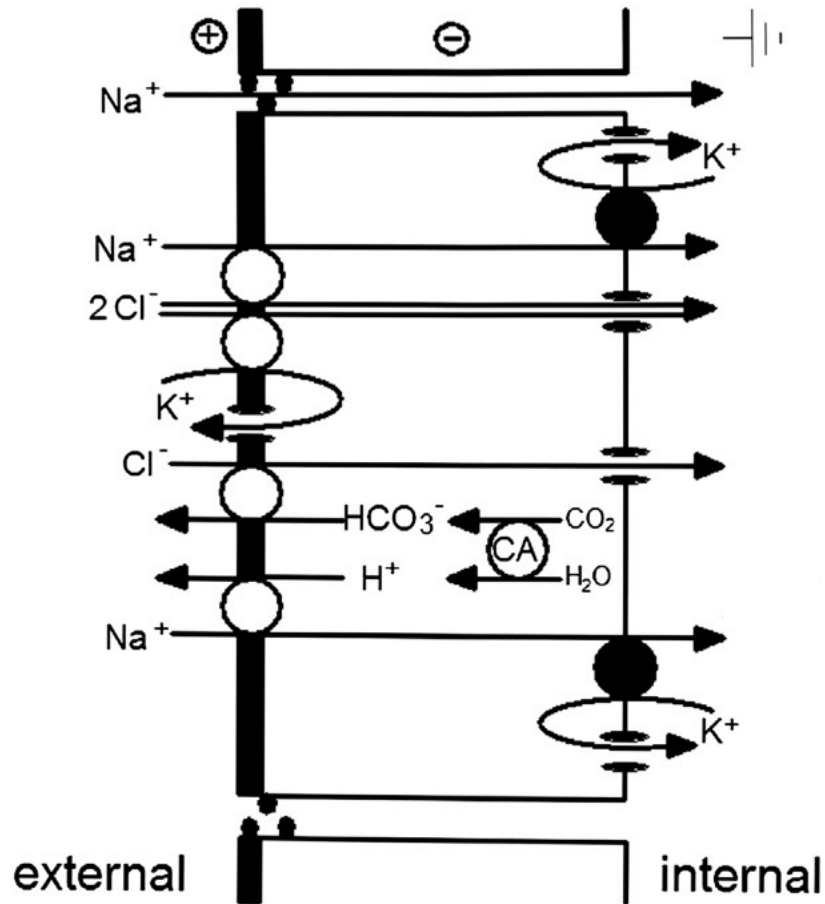


Figura 5: Modelo do mecanismo de transporte para a absorção transbranquial de NaCl pelas brânquias crustáceas. (Retirado de Freire *et al*, 2008a, modificado de Onken *et al*, 2003)

De fato, estudos anteriores da  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$  em brânquias de caranguejos hiperosmorreguladores eurihalinos encontraram que a atividade enzimática medida em homogenizados ou membranas purificadas era responsiva à salinidade ambiental, mostrando aumentos significativos diante de condições que requerem uma resposta osmorregulatória vigorosa (revisado em Lucu e Towle, 2003).

Quando caranguejos eurihalinos são transferidos da água do mar para salinidades diminuídas, tem sido descrito um aumento significativo na atividade da  $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{ATPase}$  em brânquias posteriores de várias espécies hiperosmorreguladoras incluindo *Callinectes sapidus* (Towle *et al*, 1976), *Chasmagnathus granulatus* (Castilho *et al*, 2001) *Carcinus maenas*

(Henry *et al*, 2002), *Cyrtograpsus angulatus* (López Mañanes *et al*, 2002) e *Callinectes similis* (Piller *et al*, 1995).

O estudo da atividade da anidrase carbônica e da  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  é portanto fundamental para o entendimento dos ajustes iônicos na hemolinfa de animais osmorreguladores, diante de variações de salinidade.

Como já mencionado, mecanismos osmorregulatórios são empregados para contrapor estresses osmóticos e regular as diferenças entre o meio extracelular e o meio externo ao animal. Sendo assim, animais osmorreguladores empregam gasto de energia na manutenção de um meio extracelular constante e, portanto, os tecidos internos de animais osmorreguladores dependem basicamente da regulação osmótica do líquido extracelular (AER) para manutenção do volume celular (Foster *et al*, 2010).

No entanto, em animais osmoconformadores o meio extracelular varia sua concentração osmótica conforme a variação do meio externo. Sendo assim, as células desses animais variam seu volume em função da diluição ou concentração do meio interno. Essa variação do meio interno, conseqüentemente, exige que esses animais apresentem mecanismos de regulação de volume celular. A capacidade de regulação de volume celular determina, portanto, o grau de tolerância desses animais a variações de salinidade do ambiente (Foster *et al*, 2010).

Uma alteração na concentração extracelular causará alteração no volume celular. Se a concentração extracelular for reduzida, a célula ganhará água e inchará. Contrariamente, se a concentração extracelular for aumentada, a célula murchará, perdendo água e ganhando solutos (Lang *et al*, 1998). O ganho ou perda de água pelas células de um tecido refletem o teor de hidratação do mesmo.

Deste modo, o volume celular é regulado de maneira que a célula retorne ao seu volume normal após um distúrbio, e permaneça relativamente estável, para poder desempenhar suas diferentes funções, mantendo assim o teor de hidratação do tecido. Quando a célula, depois de inchar, utiliza mecanismos para diminuir o volume, este processo é chamado de redução regulatória de volume (**RVD**). Por outro lado, mecanismos utilizados para restabelecer o volume perdido recebem o nome de aumento regulatório de volume (**RVI**) (Lang *et al*, 1998, Strange 2004).

Tanto a **RVD** como a **RVI** podem ser o resultado da ativação de um ou mais sistemas de transporte iônico e solutos orgânicos. Durante a **RVD**, as células recuperam seu volume devido à saída de solutos juntamente com a água. Já durante a **RVI**, o volume é recuperado graças à entrada de solutos, que carregam água para dentro da célula (Hoffmann e Dunham, 1995, Wehner *et al*, 2003, Strange 2004, Hoffmann *et al*, 2009). Portanto, a manutenção da hidratação de um tecido depende que células desse tecido mobilizem solutos orgânicos como aminoácidos, alguns açúcares, polióis e metilaminas; e/ou inorgânicos (íons) diante de um estresse osmótico (Strange 2004).

A regulação de volume celular é, portanto, um processo essencial em células branquiais. Essas células não só estão diretamente expostas a possíveis variações de salinidade do ambiente externo, como em animais osmoconformadores também estão expostas a variações da osmolalidade da hemolinfa. Além disso, em animais osmorreguladores devido às funções branquiais no transporte de sal através do epitélio, a depleção ou a acumulação iônica intracelular pode ocorrer e induzir alteração de volume celular, comprometendo assim a função deste órgão de importância vital.

Sabe-se através de estudos anteriores que *Hepatus pudibundus* osmoconforma e *Callinectes ornatus* osmorregula em água diluída (Togni *et al*, 2007; Foster *et al*, 2010).

Entretanto, as estratégias de mobilização de solutos para a manutenção da concentração osmótica da hemolinfa e para a regulação de volume celular no tecido branquial ainda não foram verificadas. Assim, diante de diluição espera-se encontrar diferenças entre as duas espécies. A hipótese é que *Callinectes ornatus* ative mecanismos de absorção de sal para a manutenção da concentração osmótica da hemolinfa, como a  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  e a anidrase carbônica, e que *Hepatus pudibundus* utilize mobilização de solutos osmoticamente ativos para a manutenção da hidratação tecidual.

## 2 OBJETIVOS

### Geral:

Estudar a estratégia de mobilização de solutos empregada pelos caranguejos *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus* no que diz respeito ao tecido branquial, diante de um choque hiposmótico.

### Específicos:

- Analisar a variação osmótica e iônica da hemolinfa de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus* diante de diminuição da salinidade do ambiente externo.
- Analisar a atividade das enzimas anidrase carbônica e  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  no tecido branquial de ambas as espécies quando submetidas à diminuição de salinidade.
- Comparar a capacidade de manutenção hídrica do tecido branquial (externo) em relação ao tecido muscular (interno) de ambas as espécies quando expostas à diminuição de salinidade.
- Analisar o conteúdo de osmólitos orgânicos no tecido branquial e muscular de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus* após exposição a um choque hiposmótico

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta e Manutenção dos animais

##### 3.1.1 Local de Coleta

Os crustáceos *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus* foram adquiridos junto a pescadores na praia de Ipanema, Pontal do Sul, Paraná (25°41'30.80" Sul; 48°27'50.70" Oeste). Ambas as espécies são encontradas em redes de arrasto, como fauna acompanhante da pesca do camarão sete barbas. Os animais coletados foram transportados em um recipiente térmico (isopor) até o Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação, Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná.

##### 3.1.2 Manutenção dos animais

No Laboratório os animais foram mantidos em um aquário estoque de vidro (180 L) com água do mar 33‰ (~1000 mOsm/kg de H<sub>2</sub>O); com aeradores, filtro biológico de fundo e quando necessário termostato. Normalmente a temperatura era ambiente e o fotoperíodo natural, nos dias frios quando foi necessário o uso de aquecedores com termostato, a temperatura foi mantida em 20 ± 2°C. Os animais eram alimentados com pequenos pedaços de camarão ou peixe, ou ainda carne moída de 2 a 3 vezes por semana. Os parâmetros físico-químicos, como salinidade, pH e temperatura, eram monitorados semanalmente.

### 3.2 Caracterização das respostas dos animais aos choques osmóticos

Após aclimação em aquário estoque com salinidade 33‰ por no mínimo 5 dias, exemplares das duas espécies foram submetidos em aquários individuais às seguintes condições experimentais:

- Água do mar controle - salinidade 33‰ por 0,5 hora (n = 6)
- Água do mar diluída - salinidade 25‰ por 0,5 hora (n = 6)
- Água do mar diluída - salinidade 25‰ por 8 horas (n = 6)

A salinidade do aquário estoque, assim como dos aquários experimentais foi confirmada utilizando um refractômetro (Instrutherm, modelo RTS-101ATC, Brasil). A salinidade 25‰ (~750 mOsm/kgH<sub>2</sub>O) foi conseguida através da diluição da água do mar 33‰ utilizando água doce de torneira (filtrada duplamente em filtros de carvão e celulose).

Em seguida a essa exposição, os animais foram crionestesiados e então com o auxílio de uma seringa a hemolinfa foi retirada através da membrana artrodial, na base dos apêndices locomotores e armazenada a -20 °C para posterior dosagem de íons e osmolalidade. A carapaça dos animais foi então removida e com o auxílio de pinça e tesoura as brânquias anteriores foram retiradas e armazenadas em *freezer* -20 °C para posterior análise do teor hídrico, também os 3 pares posteriores das brânquias foram retirados e armazenados em *freezer* -80 °C para posterior análise de substâncias positivas à ninidrina (NPS – aminoácidos totais) e análise da atividade das enzimas anidrase carbônica (AC) e Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPase (NaK). Um fragmento do músculo da quela direita também foi retirado e armazenado em *freezer* -20 °C para posterior análise do teor hídrico e dosagem de NPS.



### 3.2.1 Dosagem de íons e medida da osmolalidade na hemolinfa

Uma alíquota da hemolinfa foi devidamente diluída em água ultra-pura (MilliQ) para a dosagem dos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . Os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  foram dosados por fotometria de chama (Celm modelo Fc-180, Brasil), enquanto  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Mg}^{2+}$  foram dosados através de *kits* comerciais colorimétricos (Labtest®, Brasil). Os íons  $\text{Cl}^-$  presentes na amostra reagem com tiocianato de mercúrio formando cloreto de mercúrio e íons tiocianato que combinam com íons férricos formando tiocianato férrico, de cor amarela proporcional à concentração do íon. Os íons  $\text{Mg}^{2+}$  por sua vez reagem com malgon sulfonado em meio alcalino formando um complexo de cor rósea, proporcional a quantidade de íon na amostra. A leitura da absorbância realizada em espectrofotômetro (Ultrospec modelo 2100 pro – Amersham Pharmacia Biotech) com comprimento de onda de 470 e 505 nm, respectivamente. A medida da osmolalidade foi feita com uma alíquota não diluída da hemolinfa em micro-osmômetro de pressão a vapor (Wescor® 5520 VAPRO).

### 3.2.2 Teor hídrico tecidual

O teor hídrico tecidual foi calculado como forma de avaliar a variação de volume tecidual diante de um estresse osmótico. Após exposição dos animais às condições experimentais, uma lamela branquial e um fragmento do músculo da quela foram retirados, gentilmente secados em papel filtro e pesados em balança analítica com 0,1 mg de precisão (Bioprecisa modelo FA2104N, Brasil) para a obtenção do peso úmido (Pu). Em seguida, o tecido foi desidratado em estufa a 60 °C durante 24 horas e então pesados novamente para a obtenção do peso seco (Ps). O teor de hidratação do tecido (Th) foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\text{Th (\%)} = \frac{(\text{Pu} - \text{Ps})}{\text{Pu}} \times 100$$

### 3.2.3 Dosagem de NPS no tecido branquial e muscular

A análise de NPS (osmólitos orgânicos – aminoácidos totais) foi realizada através de um método colorimétrico em espectrofotômetro adaptado por [Amado \*et al\* \(2006\)](#) como descrito a seguir.

Fatias do tecido branquial ou muscular (peso em torno de 30 mg) dos animais expostos às condições experimentais foram homogeneizadas (mini homogeneizador Tecnal, modelo TE103, Brasil) em 0,5 ml de água destilada. Em seguida foram adicionados ao tubo, 1,25 ml de etanol 95 % e após a formação de um precipitado, as amostras foram centrifugadas (por 5 min a 5000 g, em microcentrifuga (Eppendorf modelo 5415D, Alemanha). O sobrenadante foi utilizado como amostra.

Para a reação das NPS, os tubos foram preparados em duplicata contendo 0,5 ml da amostra, 0,250 ml de tampão citrato (42g/L de ácido cítrico e 16g/L de hidróxido de sódio, pH 4,8) e 0,6 ml de reagente de ninidrina, o qual foi preparado utilizando 5 ml de uma solução estoque saturada de ninidrina mais 2 ml de ácido ascórbico 1 % e completado para 60 ml de etileno glicol ([Clark, 1968](#)). Os padrões foram preparados nas concentrações de 1,25 a 25 µg/ml de glicina em água destilada. Após o preparo os tubos foram levados a um banho-maria a 100 °C por 20 min, resfriados e a eles foram adicionados 1,5 ml de etanol 60 %. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, comprimento de onda de 570 nm.

### 3.2.4 Atividade da Anidrase Carbônica

Para a análise da atividade da enzima anidrase carbônica uma brânquia de cada animal foi descongelada e pesada. As brânquias foram então homogenizadas a 5%P/V (peso/volume) em tampão tris-fosfato (225mM Manitol, 75mM Sacarose, 10mM tris base e 10mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4) com auxílio de um micro-homogenizador. Em seguida o homogeneizado foi centrifugado a 9000 g e então o sobrenadante foi separado e preservado em *freezer* – 80°C. Uma alíquota do sobrenadante foi utilizada para o ensaio da atividade da enzima enquanto outra alíquota foi devidamente diluída para dosagem de proteínas totais segundo método de Bradford (1976).

A atividade da anidrase carbônica branquial foi determinada pelo método estabelecido por Vitale e colaboradores (1999) que se basearam em Henry (1991). O método consiste de monitorar alteração do pH de uma mistura que contém o homogeneizado das brânquias, o tampão tris-fosfato e água deionizada saturada com gás carbônico. A água saturada com  $\text{CO}_2$  fornece o substrato para o funcionamento da enzima de forma que a seguinte reação ocorre:  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ , e a liberação de  $\text{H}^+$  é então detectada pela redução do pH.

Assim, para o ensaio da atividade da anidrase carbônica, uma alíquota de 50µl do homogeneizado branquial foi adicionada a 7,5 ml do tampão tris-fosfato, o pH foi registrado através de pHmetro (inoLAB pH Level 1 da WTW®, Alemanha) e então 1 ml de água deionizada saturada com gás carbônico foi adicionado à mistura. A redução do pH foi monitorada por 20 segundos sendo os valores de pH registrados a cada 4 segundos. Com os valores de pH, uma reta de regressão linear em relação ao tempo foi encontrada e a inclinação da reta foi calculada. Essa inclinação corresponde à taxa de reação catalisada (TC) pela enzima presente no homogeneizado branquial. A taxa de reação não catalisada (TNC) foi

encontrada realizando o mesmo procedimento descrito acima, sem, no entanto adicionar o homogeneizado tecidual.

Dessa forma o cálculo da atividade da anidrase carbônica (AAC) foi realizado através da seguinte fórmula:  $AAC = [TC/(TNC - 1)]/\text{mg de proteína total}$ .

### 3.2.5 Atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$

A atividade específica da enzima  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  foi determinada em homogeneizado de brânquia pelo método descrito por Quabius e colaboradores (1997) e adaptado para leitora de microplaca. A atividade foi medida pela determinação da quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberada pela hidrólise de ATP.

Após descongelamento as brânquias foram homogeneizadas em tampão SEI (Sacarose-EDTA-Imidazol, pH 7,4) e o homogeneizado foi então centrifugado por 5 min a 9000 g, 4°C. O sobrenadante foi coletado para a determinação da atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  e da concentração de proteína total.

Para a medida da atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ , 10 µL do sobrenadante de cada amostra foi colocado em 6 poços de uma microplaca, então, em cada poço foi adicionado 100 µL de tampão Imidazol contendo 3 mM de  $\text{Na}_2\text{ATP}$ , pH 7,45. Em 3 poços de cada amostra foram adicionados 100 µL de tampão contendo KCl (1 mg/ml) e nos outros 3 poços tampão contendo ouabaína (1 mg/ml). A microplaca foi então incubada durante 60 min a 25°C, no escuro. Após a incubação a reação foi interrompida pela adição de 200 µL de uma mistura de 1:1 de TCA 8,6% e do reagente de cor (0,66 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  + 9,2 mM de molibdato de amônia + 0,33 mM de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) em todos os poços inclusive os brancos. Os poços brancos continham apenas tampão SEI e como padrão foi utilizado uma solução de fósforo 0,65 mM

(Sigma). A leitura foi feita em 620 nm e a atividade da enzima, expressa em  $\mu\text{M Pi/h/mg ptn}$ , após a dosagem da concentração de proteína total.

### 3.2.6 Dosagem de proteínas totais

A concentração de proteínas totais dos homogeneizados branquiais foi determinada tanto para o ensaio da enzima anidrase carbônica quanto para a  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ . Foi empregado o método colorimétrico modificado de [Bradford \(1976\)](#) que utiliza o reagente *Coomassie Brilliant Blue G-250*, este passa do vermelho ao azul ao ligar-se a proteínas. As dosagens foram realizadas em quadruplicatas em microplacas de 96 poços utilizando o *kit Bio-Rad Protein Assay* da Bio-Rad Laboratories®. A absorbância das amostras foi lida em 620nm em leitor de placas (Elisa Sunrise Tecan GMBH - Alemanha).

## **3.3 Análise Estatística**

Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Os resultados foram analisados através do teste *one way ANOVA* seguido de *Holm-sidak method* para o caso de dados normais e *Kruskal-Wallis one way ANOVA on ranks* seguido de *Tukey test* para o caso de dados não normais. Em algumas situações, as comparações foram realizadas através de teste *t*. O software utilizado foi o Sigma plot®.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Osmolalidade e concentração iônica da hemolinfa

Após a exposição a uma diluição de ~25% da água do mar (de 33 para 25‰) , a osmolalidade da hemolinfa de *Hepatus pudibundus* sofreu uma queda proporcional à magnitude do choque hiposmótico. Com apenas meia hora em uma condição diluída, a osmolalidade da hemolinfa já sofreu uma queda significativa (~10%, de  $991 \pm 4$  para  $886 \pm 11$  mOsm/kgH<sub>2</sub>O,  $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ), e ao final de 8 horas de exposição, a queda foi ainda maior (~25%, de  $991 \pm 4$  para  $747 \pm 12$  mOsm/kgH<sub>2</sub>O,  $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ), ao ponto que osmolalidade da hemolinfa do animal estava praticamente igualada com a osmolalidade da água do mar diluída (750 mOsm/kgH<sub>2</sub>O\*) (Figura 6).

Por outro lado, a concentração osmótica da hemolinfa de *Callinectes ornatus* manteve-se inalterada durante meia hora em uma condição hiposalina (de  $953 \pm 6$  para  $914 \pm 17$  mOsm/kgH<sub>2</sub>O,  $n = 6$ ); e ao final das 8 horas de exposição a osmolalidade da hemolinfa sofreu uma queda significativa em relação à situação controle (~9%, de  $953 \pm 6,4$  para  $870 \pm 13$  mOsm/kgH<sub>2</sub>O,  $p < 0,05$   $n = 6$ ). Apesar dessa queda, ao longo das 8 horas de exposição à água do mar diluída o animal foi capaz de manter a concentração osmótica da hemolinfa 120 mOsm/kgH<sub>2</sub>O acima da concentração osmótica da água diluída (750 mOsm/KgH<sub>2</sub>O\*) (Figura 6).

Comparando as duas espécies, em condição controle 33‰ *Hepatus pudibundus* é ligeiramente hiperosmótico em relação à *Callinectes ornatus* e praticamente isosmótico em relação à água do mar. Ao final de 8 horas em água 25‰ o quadro se inverte e *Hepatus pudibundus* se torna hiposmótico em relação à *Callinectes ornatus*, continuando, entretanto isosmótico em relação à água do mar, agora diluída (Figura 6).

---

\* osmolalidade calculada segundo a relação que cada 1‰ equivale a 30 mOsm

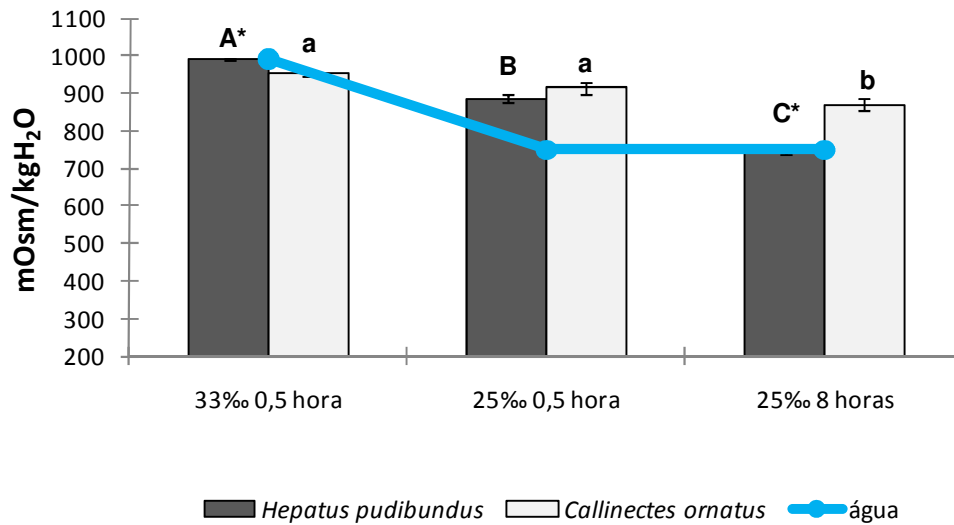


Figura 6: Osmolalidade medida da hemolinfa de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus* após exposição às diferentes condições experimentais. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as condições experimentais de cada espécie  $p < 0,05$ ,  $n = 6$ . \* indica diferença estatística entre as espécies em cada condição experimental. A osmolalidade da água foi estimada através da conversão de salinidade para osmolalidade, onde 1‰ equivale a  $\pm 30$  mOsm.

A concentração dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  na hemolinfa, em *Hepatus pudibundus* sofreu uma queda gradativa acompanhando a diluição da água do mar ( $\text{Na}^+$  de  $445 \pm 4$  para  $406 \pm 2$  mM em 0,5 hora e  $347 \pm 4$  mM em 8 horas,  $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ;  $\text{Cl}^-$  de  $404 \pm 4$  para  $356 \pm 11$  mM em 0,5 hora e  $245 \pm 8$  mM em 8 horas,  $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ) (Figura 7). A análise dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  na hemolinfa de *Callinectes ornatus* demonstrou um padrão diferente. Houve uma redução significativa somente na concentração de íons  $\text{Na}^+$  (de  $482 \pm 7$  para  $459 \pm 5$  mM em 0,5 hora e  $422 \pm 6$  mM em 8 horas,  $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ) (Figura 7). No entanto essa redução foi menor do que a redução esperada por uma simples diluição.

Quando se compara a concentração dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  nas duas espécies, *Hepatus pudibundus* possui uma maior concentração do íon  $\text{Na}^+$  em relação ao íon  $\text{Cl}^-$  tanto na condição controle, como durante o choque hiposmótico. *Callinectes ornatus* no entanto possui concentração equivalente dos dois íons.

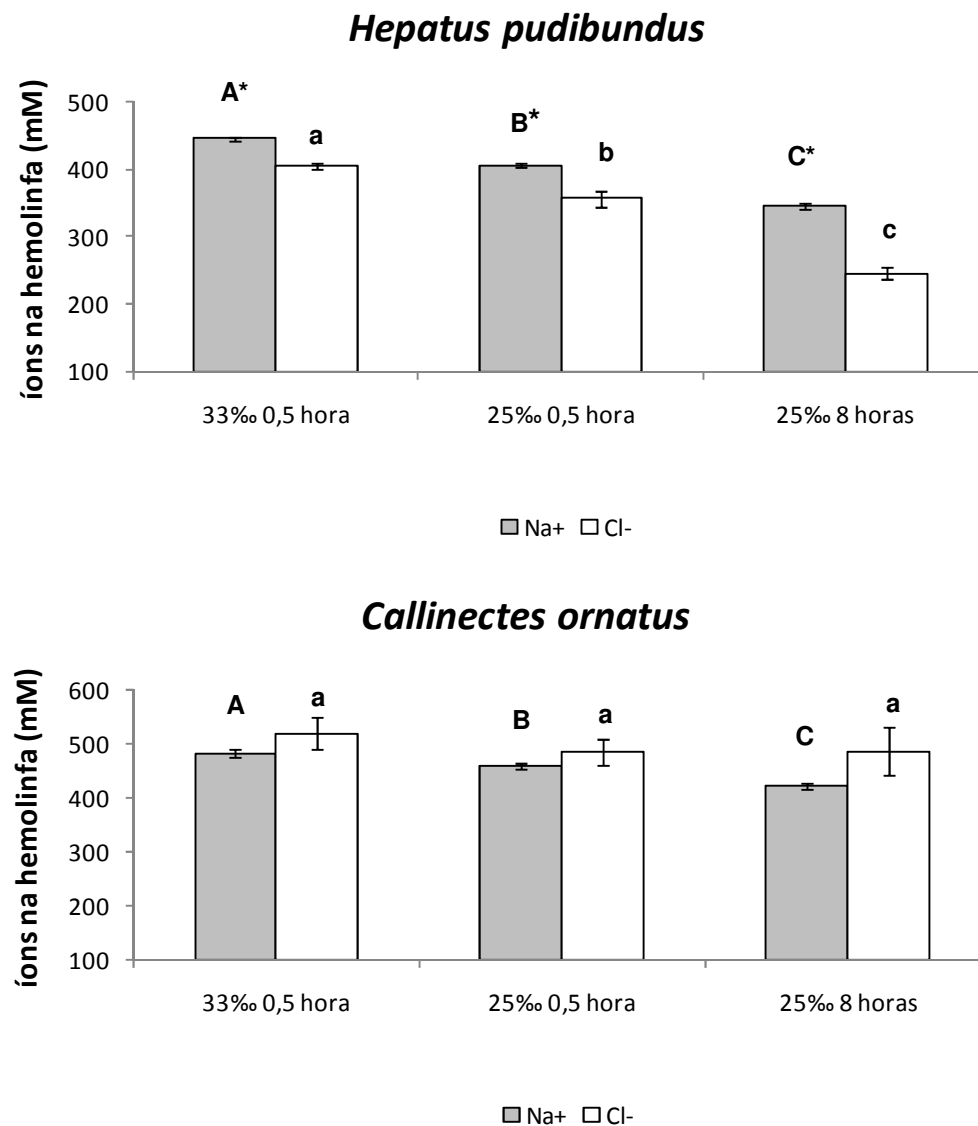


Figura 7: Concentração medida em mM dos íons Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> na hemolinfa de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus* após exposição dos animais às diferentes condições experimentais. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as condições experimentais de cada espécie,  $p < 0,05$ ,  $n = 6$ . \* indica diferença estatística entre as espécies em cada condição experimental.

Não houve diferença significativa na concentração dos íons K<sup>+</sup> e Mg<sup>++</sup> na hemolinfa de ambas as espécies. Para *Hepatus pudibundus* os valores de K<sup>+</sup> e Mg<sup>++</sup> encontrados na hemolinfa dos animais controle foi de  $15,1 \pm 1,3$  mM e  $39,2 \pm 5$  mM, enquanto em *Callinectes ornatus* foi de  $8,8 \pm 0,7$  mM e  $19,2 \pm 1,3$  mM respectivamente (Figura 8).



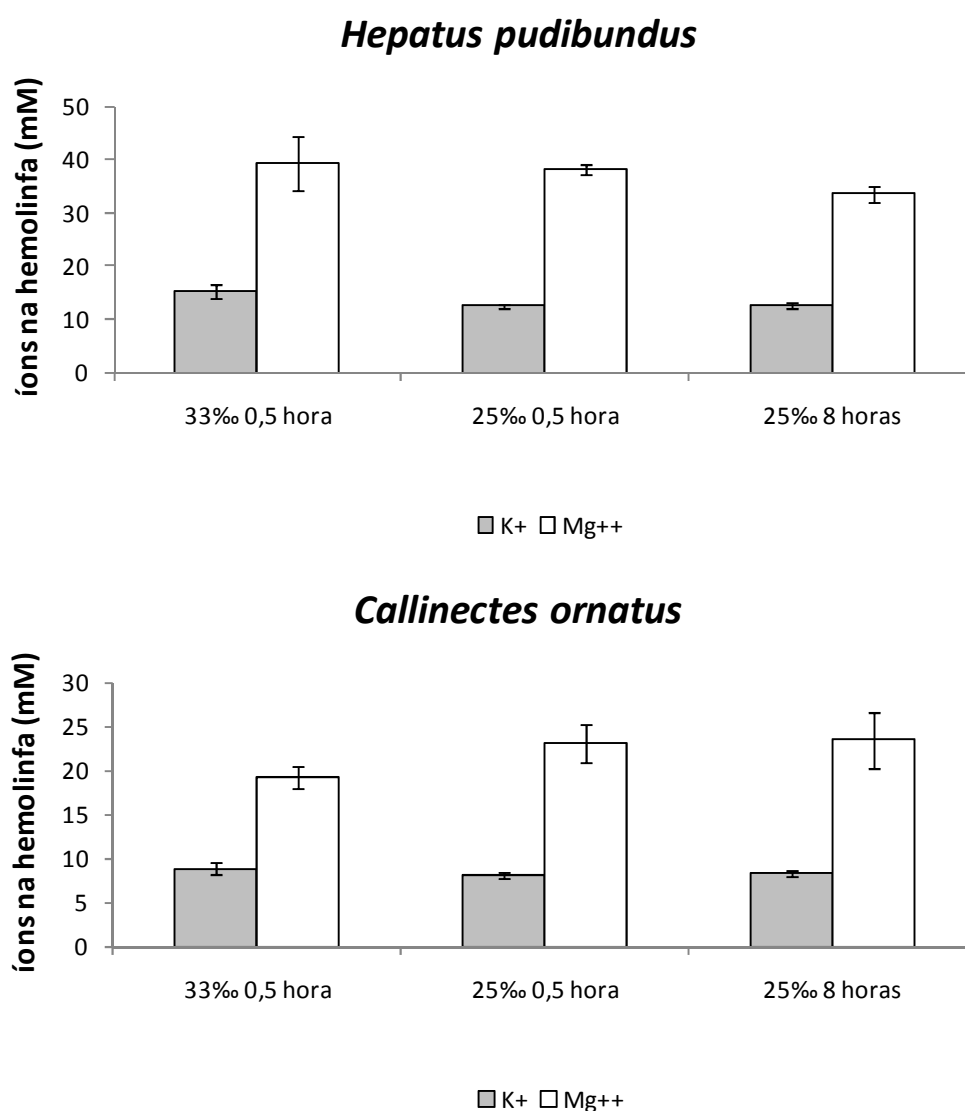


Figura 8: Concentração medida em mM dos íons K<sup>+</sup> e Mg<sup>++</sup> na hemolinfa de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus* após exposição dos animais às diferentes condições experimentais (n = 6).

## 4.2 Teor de hidratação do tecido branquial e muscular

Não houve alteração significativa na hidratação das brânquias, nem do músculo de nenhum dos animais quando estes foram expostos ao choque hiposmótico. Na condição controle o teor de água nas brânquias de *Hepatus pudibundus* foi de  $88,2 \pm 0,3\%$  e no músculo foi de  $72,1 \pm 1,3\%$ , enquanto nas brânquias de *Callinectes ornatus* foi de  $90,1 \pm$

0,6% e no músculo foi de  $73,9 \pm 1,2\%$ . Ambas as espécies possuem maior quantidade de água nas brânquias se comparado com o músculo (Figura 9).

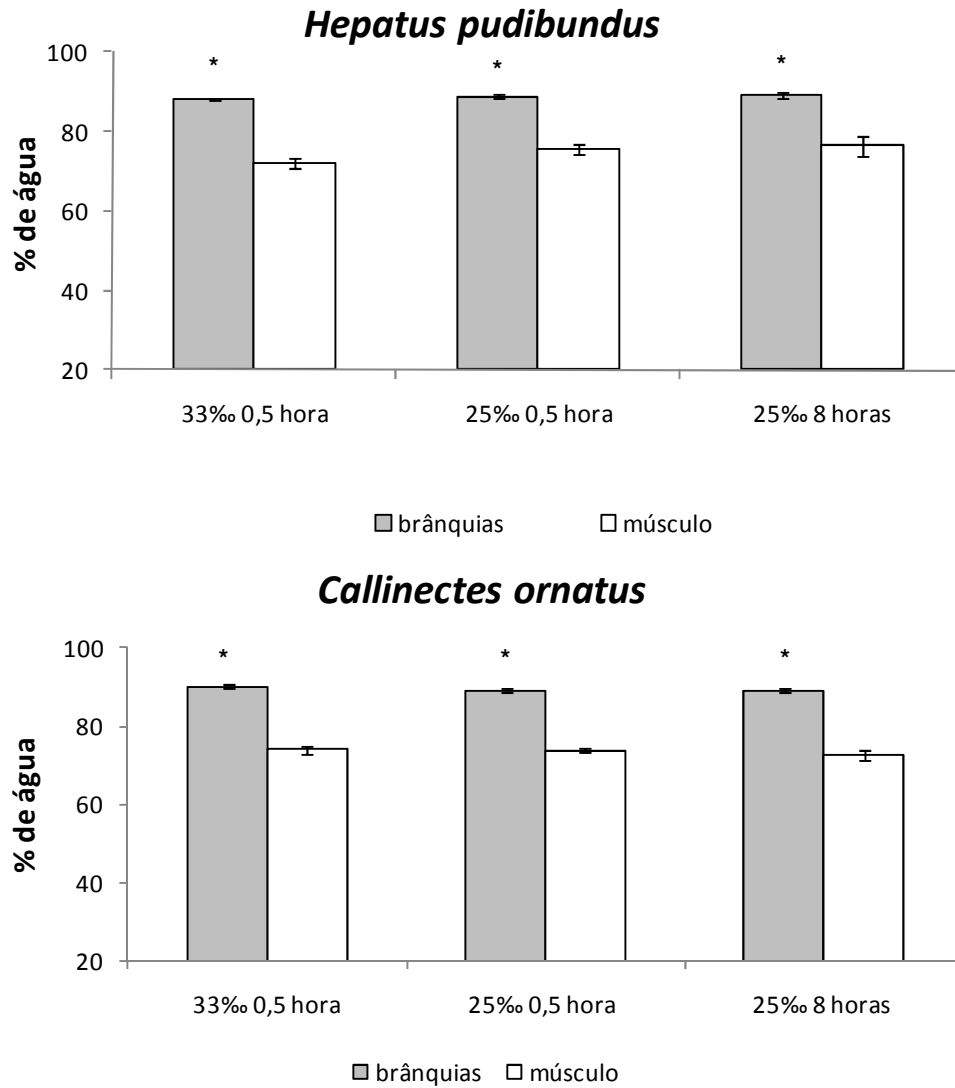


Figura 9: Teor de hidratação das brânquias e músculo de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus* após exposição às diferentes condições experimentais. Não houve diferença significativa na hidratação de cada tecido após exposição às condições experimentais (ANOVA, n=6). \* indica diferença estatística entre os dois tecidos em cada condição experimental (teste t,  $p < 0,05$ , n=6).

### 4.3 Conteúdo de NPS no tecido branquial e muscular

Após exposição dos animais ao choque hiposmótico, não houve alteração significativa no conteúdo de NPS nas brânquias de nenhuma das espécies. Para *Hepatus pudibundus*, o conteúdo de NPS na condição controle foi de  $3,1 \pm 0,4$  µg/mg de tecido fresco, para *Callinectes ornatus* foi de  $1 \pm 0,1$  µg/mg de tecido fresco (Figura 10).

No entanto, houve redução no conteúdo de NPS no músculo de *Hepatus pudibundus* quando em choque hiposmótico. Redução esta que começou em 0,5 hora de exposição e continuou reduzindo ao longo das 8 horas de exposição (de  $24,5 \pm 4,5$  4 µg/mg de tecido fresco em 33‰ para  $19,6 \pm 1,8$  4 µg/mg de tecido fresco em 25‰ 0,5h, e  $13,9 \pm 1,6$  4 µg/mg de tecido fresco em 25‰ 8h) (Figura 10). Não houve alteração significativa no conteúdo de NPS no músculo de *Callinectes ornatus*, cujo valor em situação controle foi de  $16 \pm 2,4$  µg/mg de tecido fresco (Figura 10).

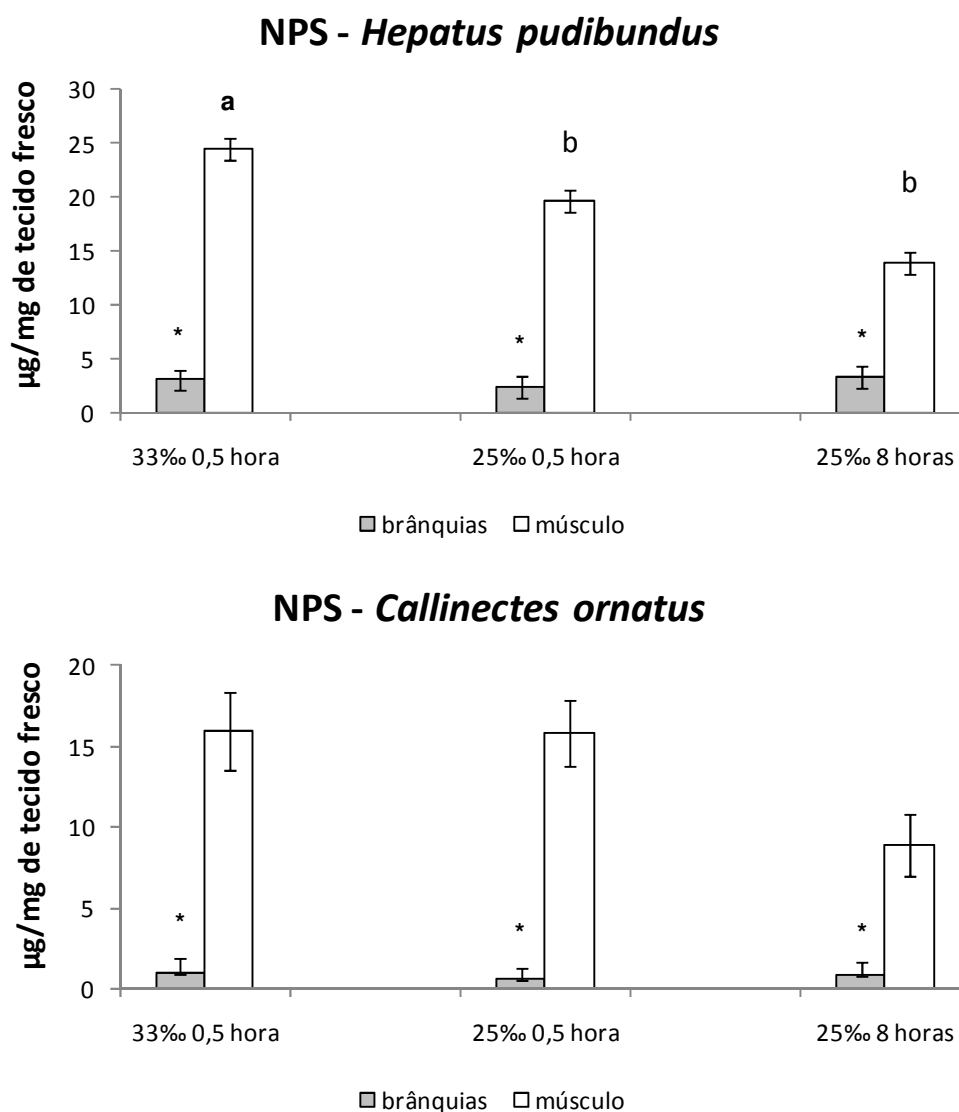


Figura 10: Concentração de NPS (substâncias positivas a ninidrina – aminoácidos totais) nas brânquias e no músculo de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus* após exposição às diferentes condições experimentais. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as condições experimentais de cada espécie,  $p < 0,05$ ,  $n = 6$ . \* indica diferença estatística entre os dois tecidos em cada condição experimental.

#### 4.4 Atividade da Anidrase Carbônica

Não foi detectada alteração na atividade da enzima anidrase carbônica diante da diluição da água do mar nas brânquias de nenhuma das duas espécies. Os valores encontrados na situação controle foram  $5,6 \pm 1,2$  atividade específica/mg ptn em *Hepatus pudibundus* e  $11,6 \pm 1,9$  atividade específica/mg ptn em *Callinectes ornatus*. Na situação controle, a

atividade específica da enzima é estatisticamente maior em *Callinectes ornatus* se comparada com *Hepatus pudibundus* (Figura 11).

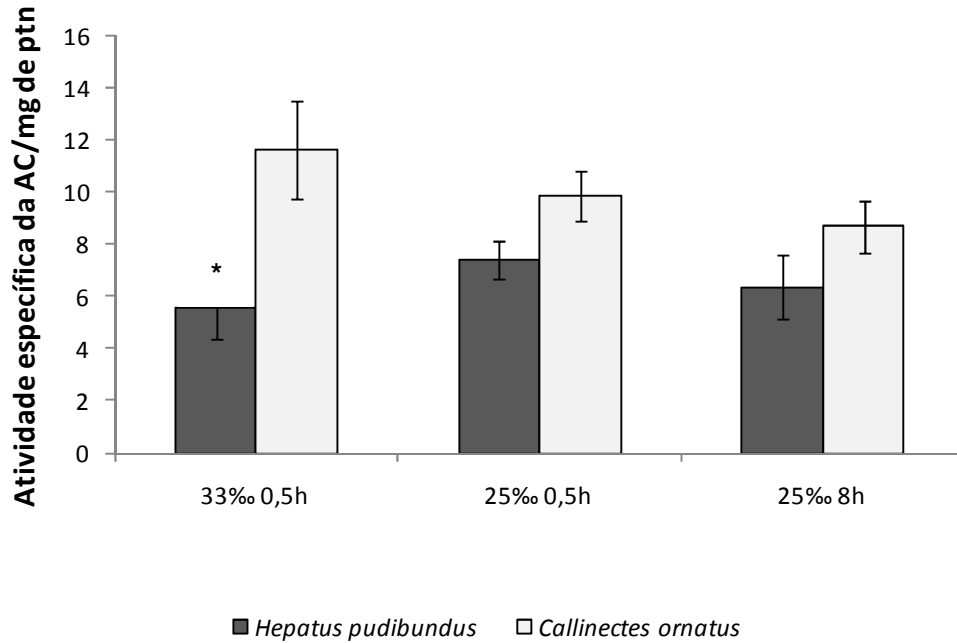


Figura 11: Atividade da enzima Anidrase Carbônica nas brânquias de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus* após exposição às diferentes condições experimentais. \* indica diferença estatística entre as duas espécies em cada condição experimental  $p < 0,05$ ,  $n = 6$ .

#### 4.5 Atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$

Quando os animais foram expostos à água diluída, houve diminuição da atividade da enzima  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  nas brânquias de ambas as espécies, já em 0,5 hora de exposição. Para *Hepatus pudibundus* a diminuição foi de  $0,13 \pm 0,01 \mu\text{Mol Pi/h}/\mu\text{g de ptn}$  em 33‰ para  $0,05 \pm 0,02 \mu\text{Mol Pi/h}/\mu\text{g de ptn}$  em 25‰ 0,5h; para  $0,07 \pm 0,01 \mu\text{Mol Pi/h}/\mu\text{g de ptn}$  em 25‰ 8h (Figura 8A). Para *Callinectes ornatus* a diminuição foi de  $0,26 \pm 0,03 \mu\text{Mol Pi/h}/\mu\text{g de ptn}$  em 33‰ para  $0,09 \pm 0,03 \mu\text{Mol Pi/h}/\mu\text{g de ptn}$  em 25‰ 0,5h; para  $0,06 \pm 0,01 \mu\text{Mol Pi/h}/\mu\text{g de ptn}$  em 25‰ 8h (Figura 12).

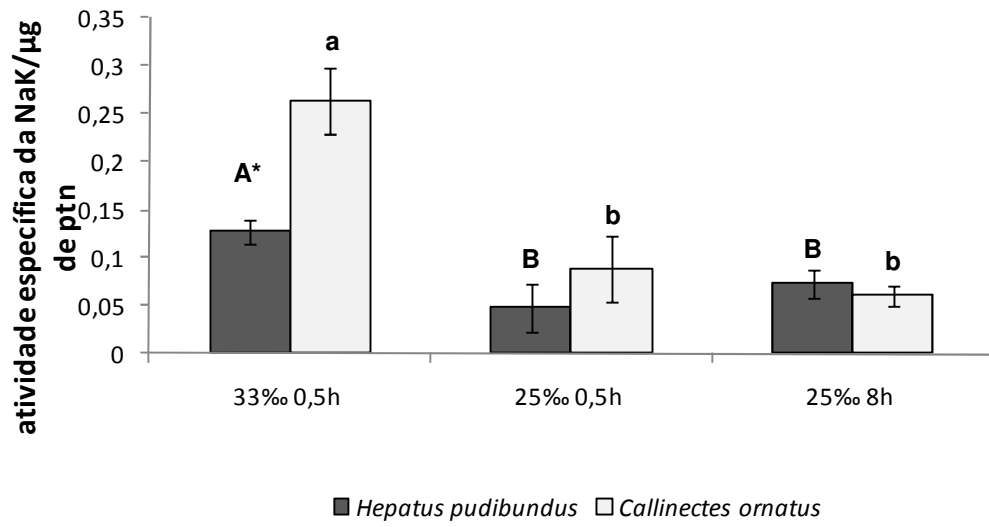


Figura 12: Atividade da enzima  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  nas brânquias de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus* após exposição às diferentes condições experimentais. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as condições experimentais de cada espécie,  $p < 0,05$ ,  $n = 6$ . \* indica diferença estatística entre as duas espécies em cada condição experimental.

## 5 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Animais aquáticos como os crustáceos, quando submetidos a uma diminuição de salinidade, podem responder de duas maneiras: manter a concentração osmótica de seu fluido extracelular constante, apesar da diminuição da concentração osmótica externa, ou então igualar a concentração osmótica de seus fluídos conforme a alteração da concentração osmótica externa. Esses são ditos osmorreguladores e osmoconformadores, respectivamente.

*Hepatus pudibundus*, conforme esperado, osmoconformou diante de diluição da água do mar. Em água do mar 33‰ a hemolinfa do animal possuía concentração osmótica praticamente idêntica à concentração osmótica da água do mar. Após a exposição à água do mar diluída, a osmolalidade da hemolinfa de *Hepatus pudibundus* sofreu uma queda proporcional à magnitude do choque hiposmótico. Com apenas meia hora em uma condição diluída, a osmolalidade da hemolinfa já sofreu uma queda significativa, e ao final de 8 horas de exposição, a osmolalidade da hemolinfa do animal estava praticamente igualada com a osmolalidade da água do mar diluída. Esses resultados corroboram com um estudo anterior do nosso laboratório nas mesmas condições (Foster *et al*, 2010).

A estratégia de osmoconformação também pode ser encontrada diante de um aumento de salinidade. O caranguejo *Hemigrapsus edwardsi*, por ter uma superfície corporal bastante permeável a íons e água, como típico de animais osmoconformadores, apresenta um rápido equilíbrio da concentração osmótica de sua hemolinfa com o meio externo diante de um choque hiperosmótico (Beadford e Leader, 1978).

Contrariamente a *Hepatus pudibundus*, *Callinectes ornatus* respondeu à diminuição de salinidade com a estratégia de osmorregulação. A concentração osmótica da hemolinfa de *Callinectes ornatus* manteve-se praticamente inalterada durante meia hora em uma condição

hiposalina e ao final das 8 horas de exposição, a osmolalidade da hemolinfa diminuiu em relação à situação controle. Apesar dessa queda, ao longo das 8 horas de exposição à água do mar diluída, o animal foi capaz de manter a concentração osmótica da hemolinfa sempre acima da osmolalidade da água diluída (120 mOsm/kgH<sub>2</sub>O a mais do que a água), indicando dessa forma ser capaz de osmorregular através de absorção ativa de sal.

O gênero *Callinectes* já é bastante conhecido por abrigar espécies hiperosmorreguladoras, ou seja, que em água diluída mantém a concentração osmótica da hemolinfa acima da água circundante. Como *Callinectes sapidus* (Engel, 1977; Piller *et al*, 1995; Lovett *et al*, 2006a), *Callinectes danae* (Masui *et al*, 2003; Masui *et al*, 2005; Togni 2007), *Callinectes similis* (Engel, 1977; Piller *et al*, 1995) e *Callinectes ornatus* (Togni, 2007). Por exemplo, *Callinectes sapidus* quando submetido a uma diminuição de salinidade por um longo tempo de exposição (de 35‰ para 10‰ por 18 dias) também apresentou uma queda da osmolalidade da hemolinfa já no primeiro dia de exposição (de ~1080 para ~790 mOsm), entretanto, apesar da queda, a hemolinfa ainda se manteve acima da osmolalidade da água a que os animais estavam expostos (~300 mOsm) (Lovett *et al*, 2006a).

Os íons Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> são os íons de maior expressão na concentração osmótica da hemolinfa. A concentração destes íons na hemolinfa de *Hepatus pudibundus* sofreu uma queda gradativa acompanhando a diluição da água do mar. Esse resultado, juntamente com o resultado da osmolalidade, indica que o animal sofreu uma diluição do seu meio extracelular na mesma proporção da diluição da água a qual ele estava exposto. Dessa forma, é possível inferir a incapacidade de absorção ativa de sal pelas brânquias, padrão típico de um animal osmoconformador. Em um estudo anterior, Foster e colaboradores (2010) não encontraram variação do íon Cl<sup>-</sup> na hemolinfa de *Hepatus pudibundus* submetidos ao mesmo choque hiposmótico do presente estudo, mas a mesma variação de íons Na<sup>+</sup> foi encontrada.



A análise de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  na hemolinfa de *Callinectes ornatus* demonstrou um padrão diferente. Até houve uma redução significativa na concentração de íons  $\text{Na}^+$ , no entanto essa redução foi menor que a redução esperada por uma simples diluição, indicando absorção ativa de íon  $\text{Na}^+$ , assim como do íon  $\text{Cl}^-$  (ou pelo menos redução na perda difusiva) cuja concentração se manteve praticamente inalterada durante todo o tempo de exposição a uma condição de diluição.

Esse resultado indica que as brânquias do animal são capazes de absorção ativa de NaCl diante de um choque hiposmótico, na tentativa de manter a concentração osmótica de seu meio extracelular o mais constante possível, comportamento típico de um animal osmorregulador. Da mesma forma, a manutenção da concentração osmótica da hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei* diante de alteração de salinidade foi conseguida graças à regulação dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  na hemolinfa do animal. Uma manutenção estreita da concentração desses dois íons permitiu a esse animal ser um bom regulador diante de um choque hiposmótico (Roy *et al*, 2007).

Interessante ressaltar que *Hepatus pudibundus* possui maior concentração de íon  $\text{Na}^+$  do que íon  $\text{Cl}^-$  na hemolinfa, independente do animal estar na água do mar ou na água do mar diluída. Sabendo que a água do mar possui maior concentração de íons  $\text{Cl}^-$  do que íons  $\text{Na}^+$  nota-se aqui, apesar da osmoconformação, um padrão de ionorregulação de  $\text{Na}^+$ .

Os íons  $\text{K}^+$  e  $\text{Mg}^{++}$  não sofreram alteração significativa na hemolinfa de ambas as espécies diante de diluição. O íon  $\text{K}^+$  é um íon de pouca expressão na osmolalidade da hemolinfa, mas que possui grande importância para a excitabilidade de células musculares e neuronais, assim é esperada a manutenção estreita desse íon no meio extracelular. Vários outros estudos com crustáceos demonstraram manutenção da concentração desse íon na hemolinfa do animal apesar de diminuição ou aumento da salinidade, como no camarão

*Litopenaeus vannamei* (Roy *et al*, 2007), nos caranguejos *Clibanarius taeniatatus* e *Clibaranius virescens* (Dunbar e Coates, 2004) e no caranguejo *Leptograpsus variegatus* (Cooper e Morris, 1997).

O íon  $Mg^{++}$  por sua vez é um íon muito importante em diversos processos celulares, o que justifica a manutenção de concentração constante, apesar da variação externa. Manutenção estreita da concentração do íon  $Mg^{++}$  também foi encontrada no caranguejo *Ocypode quadrata* diante de uma ampla variação de salinidade (0 - 48‰) em até 12 horas de exposição (Santos e Moreira, 1999) e no caranguejo *Leptograpsus variegatus* em até 3 semanas de exposição a baixas salinidades (Cooper e Morris, 1997). Entretanto, nos caranguejos *Clibanarius taeniatatus* e *Clibaranius virescens* a concentração do íon  $Mg^{++}$  foi rapidamente reduzida a concentrações iguais à da água diluída a qual os animais estavam expostos (Dunbar e Coates, 2004).

Conforme discutido até agora, o comportamento osmoconformador expõe os tecidos internos dos animais às variações de concentração osmótica e iônica, enquanto o comportamento osmorregulador protege os tecidos internos dessas variações. As brânquias no entanto, estão expostas tanto às alterações da hemolinfa como também estão expostas diretamente às variações da água a que o animal está sendo submetido. Apesar do tema principal da tese ser o tecido branquial, neste capítulo o tecido muscular também foi analisado, a título de comparação. Dessa forma, o tecido muscular foi escolhido por ser um tecido interno e ter contato somente com a hemolinfa do animal e, portanto, sujeito às alterações desta.

Quando se fala em brânquias (tecido em contato direto com o meio externo), as células desse tecido sofrem um choque hiposmótico quando o animal se encontra em água diluída, independente da estratégia osmorregulatória adotada pelo animal, se é osmorregular ou

osmoconformar. Assim, para manter suas funções vitais, é essencial que as células branquiais possuam capacidade de regulação de volume celular, de forma a manter a hidratação do tecido constante.

De fato, a análise do teor de hidratação das brânquias mostrou que, em ambas as espécies, não houve alteração do teor hídrico branquial quando os animais foram submetidos à diluição da água do mar. Esse tecido foi, portanto, perfeitamente capaz de regular a quantidade de água e manter a hidratação adequada, independente do animal ser osmorregulador ou osmoconformador.

Quando se trata do tecido muscular (tecido interno, sem contato com o meio externo), as células musculares estão sujeitas a um choque osmótico somente se houver alteração na concentração osmótica da hemolinfa. Essa alteração acontece frequentemente em animais osmoconformadores quando em contato com alterações de salinidade do ambiente externo. A capacidade de regular água tecidual de tecidos internos é o que determina o grau de eurialinidade de animais osmoconformadores (Freire *et al*, 2008b; Foster *et al*, 2010).

A análise da hidratação do tecido muscular demonstrou que, também, ambas as espécies foram perfeitamente capazes de manter o teor de hidratação muscular. Para *Hepatus pudibundus*, entretanto, o desafio celular foi maior, já que as células musculares ficaram diretamente expostas a uma intensa diminuição de osmolalidade da hemolinfa. Enquanto que em *Callinectes ornatus*, a diminuição de osmolalidade não foi tão intensa pela estratégia de osmorregular, ou seja, a absorção ativa de sal pelas brânquias diminuiu a intensidade do choque hiposmótico no tecido muscular.

A manutenção da hidratação tecidual está condicionada à capacidade de regulação de volume celular. Essa regulação de volume depende da tomada ou liberação de osmólitos. No caso de as células serem submetidas a um choque hiposmótico, mecanismos de transporte na

membrana celular são ativados para a liberação de solutos osmoticamente ativos, o que desencadeia a saída de água da célula por osmose (Lang *et al*, 1998).

Assim, para o tecido se livrar do excesso de água durante um choque hiposmótico, uma diminuição no conteúdo de osmólitos no tecido é esperada. Esses osmólitos podem ser de dois tipos: orgânicos (aminoácidos, açúcares, polióis) ou inorgânicos (íons) (Wehner *et al*, 2003; Strange 2004). No capítulo III desta tese, as vias de transporte de solutos inorgânicos que participam da regulação de volume celular das células branquiais foram analisadas. Neste capítulo, entretanto, optou-se pela análise de osmólitos orgânicos, para um efeito de caracterização das estratégias de mobilização de solutos empregadas pelos animais.

A análise de substâncias positivas a ninidrina (NPS – aminoácidos totais, osmólitos orgânicos) nas brânquias demonstrou que não houve alteração significativa no conteúdo desses osmólitos depois que ambos os animais foram submetidos à diluição. Considerando que o tecido branquial desses animais foi perfeitamente capaz de manutenção da água tecidual, e que não foi identificada a participação dos osmólitos orgânicos, possivelmente essa regulação de água tecidual está vinculada à liberação de osmólitos inorgânicos.

A regulação de volume celular através da liberação de osmólitos inorgânicos normalmente é ativada muito mais rápido que a regulação por osmólitos orgânicos. A resposta imediata ao aumento de volume é essencialmente a liberação de eletrólitos, como  $K^+$  e  $Cl^-$  por exemplo, enquanto a liberação de osmólitos orgânicos pode levar mais tempo, várias horas ou até mesmo dias. Isso porque, esse processo envolve a geração de osmólitos orgânicos através de reações metabólicas, como a quebra de proteínas em aminoácidos (Hoffmann e Dunham, 1995; Wehner *et al*, 2003). Dessa forma, para as células branquiais que estão em contato direto com o choque osmótico, o meio mais rápido e de menor custo energético de regular seu volume é através de liberação de íons já disponíveis no citoplasma.

No entanto, na análise de NPS no tecido muscular observou-se um padrão diferente. No animal osmoconformador, *Hepatus pudibundus*, houve diminuição no conteúdo de NPS já em meia hora de exposição dos animais à água do mar diluída, a qual continuou diminuindo ao longo de 8 horas. Essa diminuição no conteúdo de NPS indica a liberação desses osmólitos com o objetivo de conter o inchaço celular. Nossos resultados confirmam com a diminuição de NPS encontrada em um estudo anterior com *Hepatus pudibundus* submetido a hiposmoticidade (Foster *et al*, 2010). Alterações na concentração de NPS como essa também foram encontradas no tecido muscular do camarão *Litopenaeus vannamei*, as quais só foram identificadas quando também houve alteração na concentração osmótica da hemolinfa do animal, diante de alteração de salinidade. Ou seja, quando o animal foi exposto a água do mar diluída e manteve a concentração osmótica da hemolinfa, não houve alteração do conteúdo de NPS no tecido muscular porque não foi necessário realizar regulação de volume para a manutenção da hidratação tecidual. Entretanto diante de um choque hiperosmótico, houve aumento na concentração osmótica da hemolinfa e aumento no conteúdo de NPS muscular, indicando que esse animal utiliza acúmulo de NPS intracelular de forma a conter ou reverter a perda de água do tecido (Roy *et al*, 2007).

Santos e Moreira (1999) analisaram o conteúdo de NPS na hemolinfa do caranguejo *Ocypode Quadrata* como forma de estimar a regulação de volume tecidual desse animal. De fato, encontraram um aumento no conteúdo de NPS na hemolinfa do animal durante choques hiposmóticos, esse aumento de concentração na hemolinfa reflete a liberação de NPS pelos tecidos durante o choque hiposmótico, de forma a conter o inchaço celular. Aumento significativo da concentração de NPS também foi encontrado na hemolinfa de *Callinectes sapidus* após 4-12 horas de exposição à água do mar diluída (Henry e Watts, 2001). Em todos esses casos é possível afirmar que o sistema de regulação de volume celular, frente a uma

alteração de concentração osmótica da hemolinfa desses animais, é coordenado pelo menos em parte pelo uso de osmólitos orgânicos.

Como já mencionado anteriormente, animais osmorreguladores possuem a capacidade de absorção ativa de sal para a manutenção das concentrações osmóticas e iônicas da hemolinfa. Essa absorção é realizada principalmente pelas brânquais, através da presença de transportadores e de enzimas que catalisam essa absorção de sal, como por exemplo a anidrase carbônica.

A anidrase carbônica é uma enzima que catalisa a conversão de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) em ácido carbônico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) e este então em próton e íon bicarbonato. Próton ( $\text{H}^+$ ) e íon bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) podem ser usados como substrato para a absorção ativa de  $\text{NaCl}$  pelo epitélio branquial através dos trocadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  e  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ . Sabe-se que animais de água doce, cujo desafio é se manter hiperosmótico em relação à água frequentemente utilizam esse mecanismo para a absorção de sal (Weatly e Henry, 1987).

No entanto, apesar de nossos resultados indicarem que *Callinectes ornatus* absorve sal para a manutenção da concentração osmótica de seu meio extracelular, a anidrase carbônica parece não estar envolvida nesse processo. É interessante ressaltar que, comparando as duas espécies, a atividade dessa enzima é menor em *Hepatus pudibundus*, talvez refletindo a capacidade limitada ou até mesmo incapacidade de absorção de sal pelas brânquias desse animal. Também, Palacios e colaboradores (2004) não encontraram diferenças na atividade da anidrase carbônica em homogeneizados de brânquias do estágio pós-larva do camarão *L. vannamei* durante aclimação por 3 e 24 horas em salinidade reduzida.

Relatos de aumento da atividade da anidrase carbônica em crustáceos submetidos a diluição da água do mar só foram encontrados após um período de tempo de exposição maior

do que o realizado nesse estudo. Como após 18-24 horas em *Callinectes sapidus* (Henry e Watts, 2001; Henry 2005), ou 15 dias (Genovese *et al*, 2005) e 3 semanas (López Mañanes *et al* 2000) em *Chasmagnatus granulatus*. Entretanto, não foi encontrada diferença na atividade da AC em homogeneizados das brânquias posteriores da lagosta *Homarus gammarus* após exposição à salinidade reduzida por 2 semanas. Aumento na atividade da enzima foi encontrado apenas quando a fração citosólica das brânquias foi analisada separadamente (Pavicic-Hamer *et al*, 2003). No presente estudo, frente à diminuição de salinidade por 8 horas, a não indução da AC nas brânquias posteriores de *Hepatus pudibundus* reflete a incapacidade de absorção de sal desse animal, enquanto em *Callinectes ornatus* pode ser resultado do tempo de exposição não ter sido suficiente para ativar a resposta da enzima.

Sabendo que a  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  é considerada uma grande força motriz para o transporte iônico em células branquiais, era esperado que sua atividade aumentasse com o objetivo de promover o transporte iônico para a manutenção da osmolalidade da hemolinfa, pelo menos no animal osmorregulador. Entretanto, quando os animais foram expostos a uma diluição da água do mar houve redução brusca da atividade da enzima já em meia hora de exposição em ambas as espécies.

Apesar de existirem estudos demonstrando que a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{ATPase}$  não aumenta significativamente em homogenados branquiais dentro das primeiras 12 horas de exposição a uma salinidade diminuída, e que de fato, a atividade só aumenta depois de alguns dias em baixas salinidades (Cooper e Morris, 1997; Lovett *et al*, 2006a,b; Chung e Lin, 2006), não foi encontrado na literatura nenhum caso de diminuição da atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$  diante de um choque hiposmótico.

*Callinectes sapidus* por exemplo, quando expostos a um intenso choque hiposmótico (de 32 para 5‰) de curta duração (até 24 horas), não apresentou diferença na atividade da

$\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ . Aumento da atividade da enzima levou vários dias para ser detectado, durante o choque hiposmótico de longa duração (até 18 dias), apesar do animal demonstrar a habilidade de osmorregular já no primeiro dia de exposição (Lovett *et al*, 2006b). Entretanto, Towle e colaboradores (1976) encontraram 50% de aumento na atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  nas brânquias posteriores do caranguejo azul *Callinectes sapidus* após 3 horas da transferência dos animais para uma salinidade diminuída, porém nesse estudo não foi realizado tratamento estatístico.

O aumento de atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  relatado em crustáceos expostos durante longos períodos (dias) a uma condição hiposmótica pode ser resultado de mudanças no epitélio osmorregulatório das brânquias posteriores, isto é um aumento no número de enzimas, que então reflete no aumento da atividade (Lucu e Towle, 2003; Lovett *et al*, 2006b). É possível que numa exposição a curto prazo essa mudança no epitélio osmorregulatório não teria tempo de ocorrer, e talvez, outros sistemas de transporte que não a  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ , como por exemplo o trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+-2\text{Cl}^--\text{K}^+$  e canais de  $\text{Na}^+$ , podem ser mais importantes no controle da tomada de íons a curto prazo, como proposto por Lucu e Towle (2003).

Portanto, em poucas horas, como foi o caso desse estudo, pode ter ocorrido uma diminuição do metabolismo do animal frente à alteração de salinidade, o que explicaria a rápida diminuição de atividade da  $\text{Na}^+-\text{K}^+\text{ATPase}$ , além de também uma tendência não comprovada estatisticamente de diminuição da atividade da anidrase carbônica. E a manutenção da concentração osmótica da hemolinfa de *Callinectes ornatus* acima da água diluída pode ser pela tomada de sal por outros transportadores que não a NaK, como mencionado acima, ou ainda através de uma redução da permeabilidade à água e íons.



De um modo geral, os resultados indicam que os animais utilizam diferentes estratégias de regulação osmótica e iônica para lidar com a diminuição de salinidade e conseguir manter a hidratação de seus tecidos. Enquanto *Hepatus pudibundus* depende totalmente da regulação isosmótica intracelular para tolerar a diluição, *Callinectes ornatus* tampona parcialmente a variação do meio extracelular através de regulação anisosmótica extracelular, por outras vias que não a NaK e a AC, dependendo menos de IIR para a manutenção da hidratação tecidual.

**Efeito tóxico do chumbo sobre a regulação de volume celular branquial em caranguejos  
com diferentes comportamentos osmorregulatórios**

**Capítulo II**

## RESUMO

A regulação de volume celular é um processo essencial para a manutenção da homeostase celular. A localização das brânquias expõe suas células a alterações do ambiente externo, como variação de salinidade e presença de contaminantes, e sua função de transporte de sal trans-epitelial pode levar à depleção ou acumulação iônica intracelular. Todas essas situações podem desencadear variações de volume celular. Assim, para manter suas funções vitais, células branquiais devem apresentar capacidade de regular seu volume após tais alterações. O objetivo deste capítulo foi analisar a influência do chumbo sobre a capacidade de regulação de volume de células branquiais de *Callinectes ornatus* e *Hepatus pudibundus* em condições isosmóticas e anisosmóticas. Para tanto, células branquiais de ambas as espécies foram dissociadas e submetidas a análise de volume celular através de uma técnica de fluorescência utilizando calceína-AM. Foi analisada a capacidade das células branquiais de regular volume diante de hiposmotividade (choque hipo de 75 e 50%) e a influência do chumbo sobre a manutenção de volume celular em condições isosmóticas (isosmotividade associada a 2 concentrações de chumbo – 10 e 40 $\mu$ M). Sem a presença do chumbo, as células branquiais de ambas as espécies são perfeitamente capazes de regulação de volume celular diante do choque hiposmótico 75%. Células branquiais de *Callinectes ornatus* entretanto apresentaram um pequeno inchaço durante o choque hiposmótico de maior intensidade (50%), enquanto células de *Hepatus pudibundus* ainda apresentaram capacidade de regulação de volume. Na presença de chumbo, mesmo que sob isosmotividade, as células branquiais de ambas as espécies perderam volume. Células de *Hepatus pudibundus* apresentaram cerca de 15% de redução de volume em ambas concentrações de chumbo testadas (10 e 40 $\mu$ M), células de *Callinectes ornatus* entretanto, foram menos sensíveis à concentração de 10 $\mu$ M e apresentaram cerca de 10% de redução, enquanto na concentração de 40 $\mu$ M o volume perdido foi também de cerca de 15%. Esses resultados indicam que o chumbo promove um desequilíbrio osmótico fazendo com que as células percam água. Dessa forma, foi escolhido associar a concentração de 10 $\mu$ M aos dois choques osmóticos testados anteriormente para identificar se o chumbo alteraria a capacidade de regulação de volume apresentada pelas células. Quando o chumbo 10 $\mu$ M foi associado ao choque hiposmótico de 75% e 50%, células de *Callinectes ornatus* perderam ainda mais volume enquanto células de *Hepatus pudibundus* se mostraram capazes de regular volume celular. Foram então analisadas as possíveis vias de atuação do Pb sobre os mecanismos de regulação de volume celular através da utilização de inibidores dessas vias associados à isosmotividade, à isosmotividade + 10 $\mu$ MPb e à hiposmotividade 75% + 10 $\mu$ MPb. Para inibir canais de Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase e aquaporinas foram utilizados: verapamil, ouabaína e cloreto de mercúrio, respectivamente. Os resultados indicam que as diferenças da influência do Pb encontradas na regulação de volume celular entre as duas espécies se referem ao padrão de regulação osmótica e iônica e grau de capacidade de regulação de volume que as espécies apresentam. *C. ornatus* parece ser mais suscetível a alterações de volume celular por influência do Pb devido à maior entrada do metal através de fluxos iônicos para a absorção de sal inerentemente presentes nas células branquiais, comuns a um organismo osmorregulador. Canais de Ca<sup>2+</sup> parecem ser via de entrada de Pb, e aquaporina parece ser alvo de toxicidade do Pb pelo menos em *H. pudibundus*. O Pb parece não interferir na atividade da NaK em nenhuma das espécies. Nossos resultados indicam que os efeitos tóxicos do chumbo podem ser diferentes conforme a estratégia osmótica e iônica adotada pelas espécies e sugerem ainda que osmorreguladores são mais suscetíveis à contaminação por metal do que osmoconformadores, principalmente em situações de redução de salinidade.

## 1 INTRODUÇÃO

A regulação de volume celular é um processo essencial para a manutenção da homeostase celular. A manutenção de um volume constante diante de perturbações osmóticas tanto intra como extracelulares é um problema crítico enfrentado por todas as células animais. Mudanças de volume celular são normalmente agrupadas em duas grandes categorias: anisomótica e isomótica. Mudanças de volume anisomóticas são induzidas através de alterações da osmolalidade extracelular, e mudanças de volume isomóticas ocorrem através de alterações no conteúdo intracelular de solutos (Strange, 2004).

Células branquiais podem sofrer os dois tipos de alteração de volume celular. A função e localização das brânquias expõem suas células a alterações do ambiente externo, como variação de salinidade e presença de contaminantes. Devido à localização, as células branquiais estão diretamente expostas a flutuações de salinidade que podem desencadear variações de volume celular. Além disso, pela função de transporte de sal trans-epitelial, depleção ou acumulação iônica intracelular podem ocorrer nessas células resultando em alteração de volume celular. Para manter suas funções vitais, células branquiais devem apresentar capacidade de regular seu volume após tais alterações.

Em condições normais, a concentração osmótica do citoplasma é igual à concentração osmótica do fluido extracelular. Mudanças no conteúdo de solutos em qualquer um desses compartimentos (intracelular e extracelular) geram um gradiente osmótico trans-membrana (Strange, 2004). Pela membrana plasmática ser livremente permeável à água, qualquer gradiente osmótico resulta num fluxo imediato de água para dentro ou para fora da célula até que um novo equilíbrio osmótico seja atingido. A membrana celular de células animais, diferentemente de células procarióticas e células vegetais que possuem parede celular, é incapaz de sustentar a pressão hidrostática resultado do fluxo de água. Dessa forma, esse

fluxo causa aumento ou diminuição do volume celular. Isto significa que para a manutenção do volume celular, a osmolalidade efetiva intracelular deve ser sempre igual à osmolalidade efetiva extracelular (Russel, 2000).

Após um distúrbio osmótico o volume celular é regulado de maneira que a célula retorne ao seu volume normal, e permaneça relativamente estável, para poder desempenhar suas diferentes funções. Quando a célula, depois de inchar, utiliza mecanismos para diminuir seu volume, este processo é chamado de redução regulatória de volume (RVD). Por outro lado, mecanismos utilizados para restabelecer o volume perdido recebem o nome de aumento regulatório de volume (RVI) (Hoffmann e Dunham, 1995).

Tanto RVD como RVI podem ser o resultado da ativação de um ou mais sistemas de transporte de solutos inorgânicos e/ou orgânicos. Assim, o mecanismo de regulação de volume celular envolve que a célula realize liberação ou tomada de solutos osmoticamente ativos, principalmente íons como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , ou ainda osmólitos orgânicos como aminoácidos, metilaminas e polióis. A liberação ou tomada desses osmólitos – inorgânicos ou orgânicos – é mediada por sistemas de transporte na membrana celular (Hallows e Knauf, 1994; Lang *et al*, 1998; Whener *et al*, 2003).

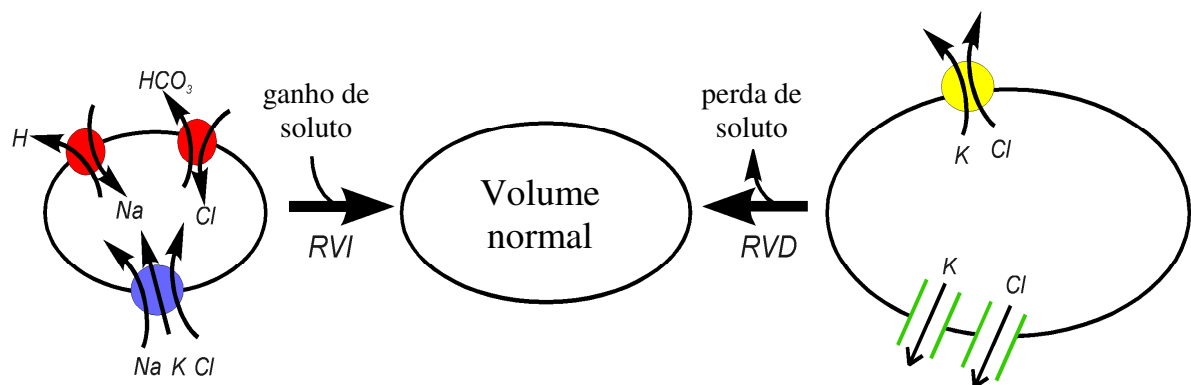


Figura13: Esquema representativo da regulação de volume celular, através de perda ou acúmulo de eletrólitos, mediada por mudanças na atividade de transportadores de membrana. Figura retirada e traduzida de Strange (2004).

Como ilustrado na figura 13, em muitas células a RVD ocorre pela liberação de KCl através da abertura de canais individuais de  $K^+$  e  $Cl^-$ , ou ainda pela ativação do cotransportador  $K^+-Cl^-$ . Já a RVI ocorre tanto pela tomada de KCl como de NaCl. O acúmulo desses sais se dá via ativação dos trocadores  $Na^+/H^+$  e  $Cl^-/HCO_3^-$  e do cotransportador  $Na^+-2Cl^-K^+$  (Strange, 2004). A participação de osmólitos orgânicos na RVD envolve a liberação desses por vias específicas, por transporte acoplado, canais de aminoácidos ou ainda aminoácidos podem ser liberados por vias aniônicas. Na RVI o acúmulo de osmólitos orgânicos é mediado por transporte acoplado, com  $Na^+$  por exemplo, de osmólitos como mio-inositol, taurina e betaína. Ou ainda por reações metabólicas como síntese de osmólitos ou degradação de proteínas em aminoácidos (Wehner *et al*, 2003; Strange, 2004) (Figura 14).

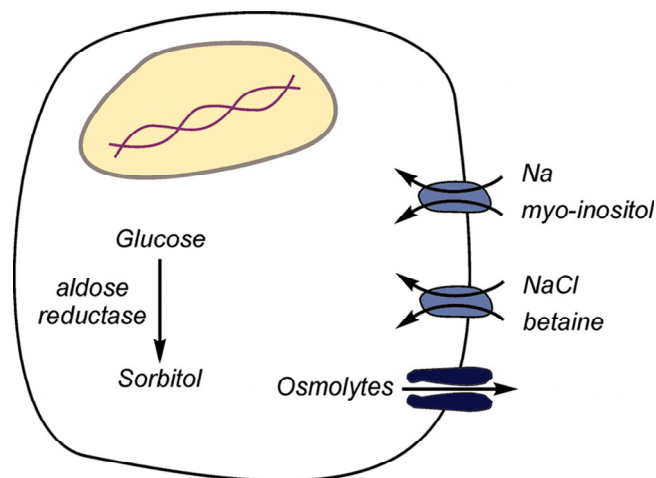


Figura 14: Modelo esquemático da liberação e acúmulo de osmólitos orgânicos durante o processo de regulação de volume celular. Figura retirada de Strange (2004).

Embora ainda se discuta sobre a mobilização de osmólitos orgânicos ou inorgânicos durante a regulação de volume celular, segundo Hoffmann e Dunham (1995) a resposta imediata ao aumento ou diminuição do volume da célula (de segundos a minutos) é essencialmente perda ou tomada de eletrólitos pela célula (**RVD** e **RVI** a curto prazo,

respectivamente). Em uma escala maior de tempo (de horas a dias), a regulação de volume depende principalmente da perda ou do acúmulo de osmólitos orgânicos dentro da célula (**RVD** e **RVI** a longo prazo, respectivamente). A mobilização de osmólitos inorgânicos pode ser muito rápida porque é mediada através de canais e transportadores que residem continuamente na membrana plasmática, ou estão estocados em vesículas citoplasmáticas sub-membrana. Entretanto, a mobilização de osmólitos orgânicos é um processo mais lento porque depende de transcrição e tradução de genes que codificam transportadores desses osmólitos e síntese de enzimas (Strange, 2004).

Diante de um choque hiposmótico, para conter o inchaço celular e prevenir uma eventual lise osmótica, as células liberam solutos osmóticos juntamente com água e assim recuperam o inchaço. Entretanto, usualmente as células não são capazes de retornarem ao volume inicial. Aliás, poucas células são capazes de recuperar seu exato volume original (Pierce, 1982). De fato, estudos utilizando tecidos ou células isoladas de invertebrados diante de choque hiposmótico têm demonstrado recuperação do volume celular, sem no entanto restabelecerem seu volume original (Smith e Pierce 1987; Souza e Scemes 2000; Ruiz e Souza, 2008).

Contrariamente à recuperação do inchaço celular – mesmo que parcialmente – diante de um choque hiposmótico, estudos com tecidos isolados, tanto de invertebrados como vertebrados, têm demonstrado que, na maioria dos casos, o murchamento induzido por aplicação de condições hiperosmóticas não é seguido por um ajuste de volume (Kévers *et al*, 1979). Nem todas as células possuem a capacidade de retornar ao seu volume original após um choque hiperosmótico, possivelmente pelo fato de mecanismos de acúmulo de osmólitos orgânicos serem lentos demais para induzir uma mudança de volume significativa. Ainda postula-se que altas concentrações de sais inorgânicos como NaCl e KCl perturbam o funcionamento de enzimas e outras proteínas celulares (Wehner *et al*, 2003).

Como já discutido, RVD e RVI mobilizam solutos através de ativação de transportadores pré-existentes, expressão de novos transportadores ou ainda síntese osmólitos orgânicos. Os processos de sinalização celular para desencadear esses eventos ainda não são completamente estabelecidos. Vários mecanismos de sinalização têm sido propostos incluindo mudanças induzidas por estiramento ou compressão na tensão da membrana, alterações na interação do citoesqueleto com proteínas de membrana e com a matriz extracelular, aumento na concentração da  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, produção de vários eicosanóides, liberação de fosfatos de inositol pela fosfolipase C, ativação de diversas proteínas quinases, além de concentração de macromoléculas citoplasmáticas (Force e Bonventre, 1994; Wehner *et al*, 2003; Strange, 2004). Aparentemente, mais de um desses processos podem estar ao mesmo tempo envolvidos na sinalização para a regulação de volume celular.

Entre os processos bioquímicos e biofísicos que vêm sendo propostos como mecanismos de transdução de sinal para reverter alterações no volume celular, talvez, nenhum deles têm sido evocado com tanta frequência como as alterações de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. A participação de cálcio na regulação de volume celular foi encontrada em muitos sistemas celulares. Em particular, a regulação do inchaço celular (RVD) parece estar frequentemente acompanhada pela sinalização de cálcio (Lang *et al*, 1998; Wehner *et al*, 2003). No caso de um estresse hiperosmótico, outros processos de transdução de sinal parecem ser responsáveis pela recuperação do volume celular, os relatos de que a RVI é dependente de cálcio são muito raros (Erickson *et al*, 2001).

Devido ao fato dos principais mecanismos de regulação de volume celular, assim como mecanismos de sinalização para a regulação de volume, envolver a atuação de cátions como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , metais como chumbo podem ter influência direta nesse processo fisiológico fundamental para a homeostase celular. Postula-se que o chumbo entre na célula através de mimetismo com o  $\text{Ca}^{2+}$  usando as vias de transporte desse íon (Rainbow 1995,



1997; Bridges e Zalups, 2005), dessa forma o chumbo pode influenciar nos mecanismos de regulação de volume celular que envolve  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. O chumbo pode ainda diminuir influxo unidirecional de  $\text{Na}^+$  (Wright, 1995; Ahern e Morris 1998), muitas vezes correlacionado com a inibição da  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  (Ahern e Morris, 1998), enzima essencial na manutenção do volume celular.

Assim, estudar a influência do chumbo sobre a regulação de volume celular branquial se torna muito relevante, principalmente comparando espécies que possuem mecanismos de regulação osmótica e iônica diferentes.

## 2 OBJETIVOS

### Geral

Analisar o efeito do chumbo sobre a capacidade de regulação de volume das células branquiais de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus*

### Específicos

- Avaliar a capacidade das células branquiais de executarem RVD diante de um choque hiposmótico
- Analisar se o chumbo influencia na manutenção de volume das células branquiais sob isosmoticidade
- Associar o chumbo ao choque hiposmótico para determinar a influência deste sob a capacidade das células branquiais executarem RVD
- Analisar possíveis vias de regulação de volume celular assim como a influência do chumbo sobre elas

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta e Manutenção dos animais

Os animais utilizados para os experimentos desse capítulo foram coletados e mantidos em condições descritas no capítulo I. Ver item 3.1 da página 38.

#### 3.2 Preparo das soluções experimentais

Para os experimentos, foram preparadas a solução controle (correspondente à hemolinfa dos animais) e soluções experimentais de diferentes concentrações de chumbo.

##### 3.2.1 Solução controle

A solução salina controle, correspondente a hemolinfa dos animais, foi preparada com os seguintes sais: NaCl 470mM; KCl 8mM; CaCl<sub>2</sub> 15mM; MgSO<sub>4</sub> 10mM; Hepes 10mM; Glicose 5mM. A osmolalidade média medida foi em torno de 950mOsm, pH 7,6.

##### 3.2.2 Soluções Pb

Foi preparada, em água destilada, uma solução estoque de 10 mM de nitrato de chumbo - Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. A partir dessa solução foram feitas diluições em solução salina controle para atingir a concentração final de nitrato de chumbo desejada: 1μM; 10μM; 20μM e 40μM. Essa faixa de concentração foi escolhida por ter sido encontrada na hemolinfa de caranguejos expostos por até 30 dias a 0,5 e 100 mg/L de nitrato de chumbo (Tulasi et al, 1987; Ahern e Morris, 1998). Todas as soluções, inclusive a estoque, foram preparadas em tubos *falcon* previamente acidificados.

### 3.3 Determinação da concentração de chumbo nas soluções experimentais

A determinação da concentração de chumbo dissolvido e chumbo total foram realizadas em espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite (A Analyst 700, Perkin Elmer). Para tanto, as soluções foram preparadas em tubos *falcon* previamente acidificados. Após o preparo, 10 ml de cada solução foram imediatamente fixados em ácido nítrico 1% e armazenados em geladeira para posterior dosagem de chumbo total, enquanto outros 10 ml foram filtrados em unidades filtrantes com poro de 0,45  $\mu\text{M}$ , também fixados com ácido nítrico 1% e armazenados para posterior dosagem de chumbo dissolvido.

### 3.4 Dissociação das células

Para o processo de isolamento das células branquiais, exemplares das duas espécies foram crioanestesiados e sua carapaça foi removida. Os 3 pares posteriores das brânquias de *Callinectes ornatus* ou todos os pares branquiais de *Hepatus pudibundus*<sup>1</sup> foram então retirados e colocados num becker de 10 ml contendo PBS<sup>2</sup>.

Após esse período, com auxílio de uma seringa as brânquias foram perfundidas com PBS através do canal eferente da hemolinfa. Esse procedimento de lavagem e perfusão tem o objetivo de tentar remover o máximo possível de hemócitos circulantes. Depois da lavagem, o canal eferente da hemolinfa foi retirado com o auxílio de uma tesoura para facilitar a separação das células.

---

<sup>1</sup> em um animal osmorregulador os pares posteriores tem função osmorregulatória enquanto os anteriores possuem função respiratória, nos animais osmoconformadores aparentemente não existe essa distinção (Towle, 1993; Freire et al, 2008a)

<sup>2</sup> PBS (*Phosphate Buffer Saline*) foi preparado com osmolalidade corrigida para se adequar aos valores de osmolalidade da hemolinfa dos animais: NaCl 400mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,5mM; KCl 20mM, osmolalidade média medida em torno de 940mOsm

Durante os testes piloto, foi utilizado tripsina (0,05%) para liberar as células por digestão enzimática do tecido. No entanto, por verificar que a viabilidade celular era menor quando a tripsina era utilizada passamos a dissociar as células somente com a adição de 5 mM de EDTA ao PBS. As brânquias foram então transferidas para uma placa de petri contendo PBS + EDTA e com o auxílio de um estilete cortadas em pedaços bem pequenos. A partir daí a dissociação foi auxiliada mecanicamente por movimentos repetitivos com pipeta *pasteur*. Todo esse procedimento foi realizado em temperatura ambiente, mas repousando a vidraria utilizada sobre gelo.

Depois de dissociadas, as células foram filtradas em uma malha com poros de 30µm para remover restos de tecido e então centrifugadas a 290 g por 5 min a 20°C em centrífuga refrigerada (Eppendorf Centrifuge 5810 R, Alemanha). Após a centrifugação as células foram ressuspensas em PBS e contadas em câmara de Neubauer para se determinar o número de células por ml e por sua vez o número total de células obtidas. Se necessário, as células foram centrifugadas novamente e resuspensas em um novo volume para adequar o número de células desejado para cada etapa experimental a um determinado volume requerido.

#### 3.4.1 Viabilidade Celular

Alíquotas da suspensão de células foram utilizadas para a determinação da viabilidade celular através do método de exclusão utilizando azul de tripan. O azul de tripan cora em azul células não viáveis, e a inviabilidade é caracterizada pela permeabilidade das células ao corante. Dessa forma a alíquota da suspensão de células era diluída 1:1 numa solução de azul de tripano 0,1% em PBS e em então contadas em câmara de Neubauer. Fazendo uma relação do número de células não coradas de azul pelo número de células totais é conseguida a

porcentagem de células viáveis daquela dissociação. Para a realização dos experimentos, foram utilizadas dissociações celulares com no mínimo 80% de viabilidade.

### 3.5 Análise da toxicidade do chumbo sobre as células branquiais

Células recém dissociadas foram expostas a 4 concentrações de nitrato de chumbo  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ : 1, 10, 20 e 40  $\mu\text{M}$ ; em 3 tempos experimentais: 1, 3 e 6 horas. Além disso, células que não foram expostas ao nitrato de chumbo (controle) também foram acompanhadas nos diferentes tempos experimentais.

O teste de viabilidade seguiu-se em câmara de Neubauer como já mencionado acima. Uma alíquota de células foi contada imediatamente após a dissociação para compor o controle inicial. Em seguida, as outras alíquotas de células expostas ou não ao chumbo foram contadas ao longo dos tempos experimentais. Dessa forma foi possível monitorar a viabilidade celular ao longo do tempo, com e sem interferência do chumbo. Além de fornecer um resultado da toxicidade do chumbo sobre as células branquiais, este teste foi importante para definir a concentração de chumbo a ser utilizada em outros ensaios *in vitro* como também para definir o tempo de exposição.

### 3.6 Análise da regulação de volume celular

Para detectar as mudanças de volume celular foi empregada uma técnica de fluorescência chamada “Fluorescence Self-quenching”, descrita por Hamann *et al*, 2002; Capó-Aponte *et al*, 2006. Resumidamente, certos fluoróforos em altas concentrações sofrem o processo de auto-extinção, isto é, a intensidade da fluorescência diminui com o aumento da concentração do fluoróforo. Dessa forma, essa propriedade física dos fluoróforos pode ser

usada para medir alterações do volume de água nas células numa relação diretamente proporcional. Quanto menos água, maior a concentração de fluoróforo e, portanto menor a intensidade da fluorescência. Assim, uma diminuição de fluorescência significa perda de água e redução do volume celular. E um aumento da fluorescência significa ganho de água e aumento do volume celular.

Células branquiais recém-dissociadas foram colocadas em uma placa preta de 96 poços específica para fluorescência (*Optiplat 96-well, Black*), em uma densidade de aproximadamente  $10^4$  células por poço, e ficaram repousando em solução salina controle por meia hora. Após o repouso, a auto-fluorescência dessas células foi medida de maneira a confirmar se as células estavam equivalentemente distribuídas nos poços.

A placa foi então centrifugada a 290 g por 5 minutos em uma centrífuga de placas (Eppendorf Centrifuge 5810 R, Alemanha) para substituir a salina controle por solução salina controle acrescida do fluoróforo Calceína-AM (10 $\mu$ M). Essa etapa de incubação durou 1 hora, e durante esse período, para acompanhar a entrada da Calceína-AM na célula, a fluorescência foi lida a cada 3 minutos num leitor de placas (Tecan Infinite M200, Áustria) com excitação de 485nm e emissão de 530nm. Isso porque só dentro da célula que esterases clivam o grupo AM (acetoximetil) produzindo calceína fluorescente não-permeante através da membrana, ou seja, a calceína sem o grupo AM apresenta uma forte fluorescência verde e não pode sair da célula (Hamann *et al*, 2002). Dessa forma, o acompanhamento da emissão de fluorescência durante o período de incubação servia também para verificar se as células estavam ativas e viáveis. O gráfico a seguir foi confeccionado com as médias da auto-fluorescência (tempo 0) e de fluorescência medida durante a incubação com calceína-AM em todas as dissociações realizadas das duas espécies, possuindo caráter apenas informativo.

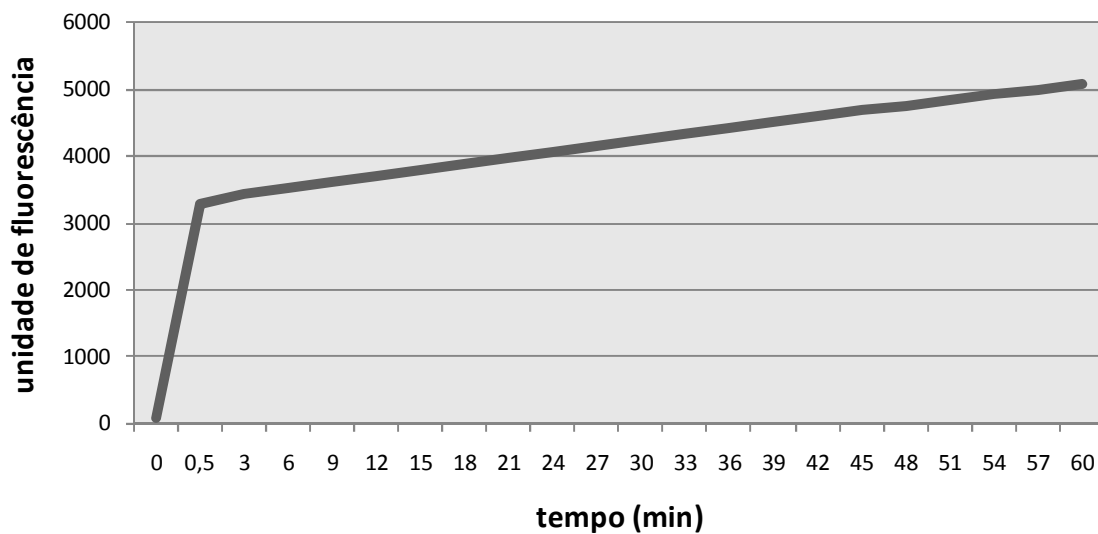


Figura 15: Gráfico representativo da emissão de fluorescência pelas células branquiais de ambas as espécies durante o período de incubação com calceína-AM.

Após a incubação, a placa foi novamente centrifugada e a solução de calceína foi substituída por solução salina controle. A fluorescência isosmótica foi então lida a cada 30 segundos por 5 min. Essa etapa era importante para analisar a estabilidade da emissão de fluorescência. Sabendo que as células estão em solução isosmótica, nenhuma, ou quase nenhuma, variação de fluorescência era esperada. O gráfico a seguir, novamente com caráter informativo, foi confeccionado utilizando as médias da transformação de valores absolutos de fluorescência em valores relativos, onde 1 se refere à primeira leitura de fluorescência sob isosmotividade.



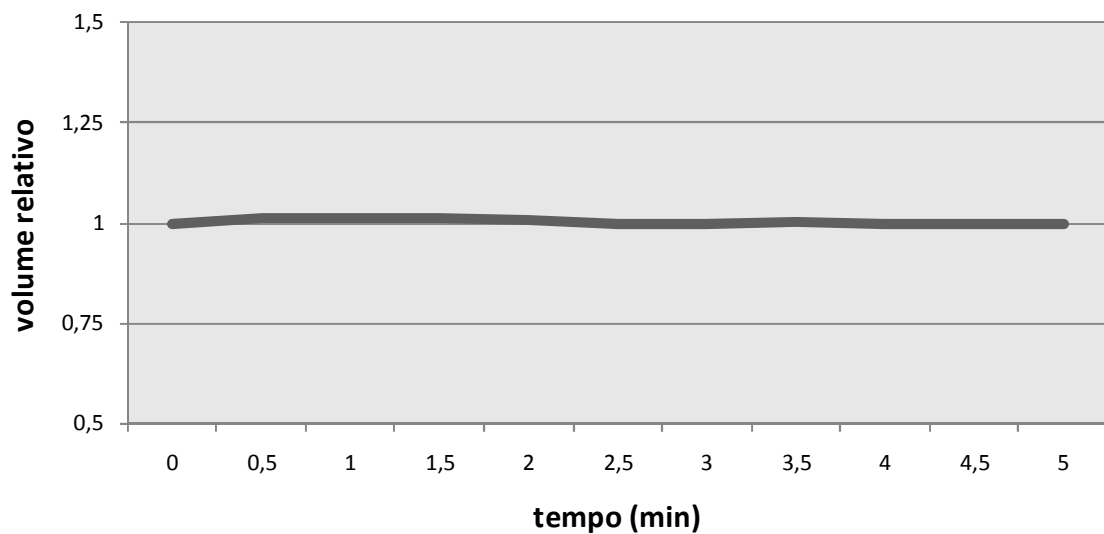


Figura 16: Gráfico representativo de manutenção de volume relativo de células branquiais de ambas as espécies durante 5 minutos em solução salina isosmótica imediatamente após o período de incubação com calceína-AM.

A placa foi centrifugada novamente e então as células foram submetidas às seguintes condições: controle, choque hiposmótico 75% (25% de redução), choque hiposmótico 50% (50% de redução). Os choques hiposmóticos foram obtidos através de diluição da solução salina controle. A osmolalidade medida da salina controle foi 948mOsm, e dos choques hiposmóticos foi de 706mOsm e 484mOsm para os choques de 75% e 50% respectivamente. A fluorescência foi lida novamente a cada 30 segundos durante 20 min. Para compor os gráficos dos resultados, os valores absolutos de fluorescência foram transformados em valores relativos, onde 1 significa o volume inicial.

### 3.7 Efeito do chumbo sobre a regulação de volume celular

A análise do efeito do chumbo sobre a variação de volume celular foi realizada em duas etapas. Na primeira foi analisado se o chumbo influenciava a manutenção do volume

celular em condição isosmótica. Para tanto, como descrito acima, as células foram submetidas à condição controle (isosmótica) e às condições controle + Pb 10uM e controle + Pb 40uM.

Numa segunda etapa, analisando os resultados de alteração de volume das células tanto nas condições anisosmóticas sem chumbo, como nas condições isosmóticas com chumbo, foi escolhido que ambos os choques hiposmóticos seriam associados ao chumbo apenas na concentração de 10uM. Dessa forma, como descrito anteriormente, as células foram expostas à condição controle e às condições hiposmótica 75% + Pb10uM e hiposmótica 50% + Pb10uM.

### **3.8 Análise de possíveis vias envolvidas na regulação de volume celular**

Nessa etapa foi analisado o efeito do chumbo sobre algumas possíveis vias utilizadas na regulação de volume celular. Para tanto, inibidores dessas vias foram adicionados individualmente à solução salina controle, à solução isosmótica + 10μM Pb e à solução hiposmótica 75% + 10μM Pb. Para inibir a atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase foi utilizado ouabaína na concentração de 100μM e canais de Ca<sup>2+</sup> foram bloqueados com verapamil 100μM. O primeiro transportador é um possível alvo do efeito da toxicidade por Pb e o segundo uma possível via de entrada do metal. Também, preliminarmente foi avaliado o efeito do chumbo sobre canais de água, aquaporinas, através da inibição com cloreto de mercúrio (ver anexo I).

### **3.9 Análise estatística**

Os dados foram apresentados como média ± erro padrão da média. Para a viabilidade celular foi aplicado o teste *one way ANOVA* seguido de *Holm-sidak method* para o caso de

dados normais e *Kruskal-Wallis one way ANOVA on ranks* seguido de *Tukey test* para o caso de dados não normais. Os dados de volume celular sofreram tratamento estatístico somente nos tempos 0,5; 5; 10; 15 e 20 minutos. Foi aplicado em cada um desses tempos experimentais, comparando os diferentes tratamentos, o teste *one way ANOVA* seguido de *Holm-sidak method* para o caso de dados normais e *Kruskal-Wallis one way ANOVA on ranks* seguido de *Dunn`s method* para caso de dados não normais além de teste *t* na análise dos inibidores. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ . Todo o tratamento estatístico foi executado pelo software Sigma Plot<sup>®</sup>.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Concentrações de chumbo dissolvido e total nas soluções experimentais

A solução salina controle e as soluções salinas de nitrato de chumbo 1, 10, 20 e 40  $\mu\text{M}$  apresentaram, após dosagem em espectrômetro de absorção atômica, concentrações de chumbo total e dissolvido conforme apresentado na tabela 1.

	Chumbo total (mg/L)	Chumbo dissolvido (mg/L)
Salina controle	0	0
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 1 $\mu\text{M}$	0,072	0,067
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 10 $\mu\text{M}$	5,45	0,655
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 20 $\mu\text{M}$	9,28	3,73
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 40 $\mu\text{M}$	19,25	4,78
Hipo75% + 10 $\mu\text{M}$	5,69	2,35
Hipo50% + 10 $\mu\text{M}$	5,17	3,43

Tabela 1: Concentração de chumbo total e dissolvido medido em mg/L nas soluções de nitrato de chumbo utilizadas nos ensaios *in vitro*.

### 4.2 Efeito do chumbo sobre a viabilidade das células branquiais

Após exposição das células branquiais recém-dissociadas de *Hepatus pudibundus* às condições experimentais houve queda da viabilidade celular tanto em função do tempo de exposição como em função da concentração de nitrato de chumbo utilizada (Figura 17). Em função do tempo, as células apresentaram queda de viabilidade (26,7%, de 100 para  $73,3 \pm 2,4\%$ ,  $p < 0,05$ ,  $n = 4$ ) apenas após 6 horas de exposição. A exposição das células ao nitrato de chumbo ocasionou queda da viabilidade já em 1 hora de exposição à concentração de 40  $\mu\text{M}$  (19,9%, de 100 para  $80,1 \pm 1,8$ ,  $p < 0,05$ ,  $n = 4$ ). Após 3 horas de exposição ao chumbo, houve queda de viabilidade nas concentrações de 1  $\mu\text{M}$  (20,3%, de 100 para  $79,7 \pm 3,7$ ,  $p <$

0,05, n = 4), 20  $\mu$ M (27,1%, de 100 para  $72,9 \pm 5,5$ ,  $p < 0,05$ , n = 4) e 40  $\mu$ M (27%, de 100 para  $73 \pm 2,8$ ,  $p < 0,05$ , n = 4). Com 6 horas de exposição todas as concentrações (1, 10, 20 e 40  $\mu$ M) de chumbo afetaram igualmente a viabilidade celular (de 100 para  $68,8\% \pm 4\%$ , para  $63,7 \pm 1,5\%$ , para  $64,3 \pm 2,9\%$  e para  $55 \pm 2,9\%$ , respectivamente,  $p < 0,05$ , n = 4) (Figura 17).

As células branquiais de *Callinectes ornatus*, entretanto, só apresentaram queda de viabilidade na presença do chumbo (Figura 17). A viabilidade celular não foi afetada por nenhuma concentração de nitrato de chumbo após 1 hora de exposição, e somente foi afetada após 3 horas de exposição na concentração de 40  $\mu$ M (de 100 para  $57\% \pm 4,3$ ,  $p < 0,05$ , n = 5). Após 6 horas de exposição houve queda de viabilidade para as concentrações de 10, 20 e 40  $\mu$ M (de 100 para  $52,9 \pm 4,1\%$ , para  $49,4 \pm 7,4\%$  e para  $41,8 \pm 5,4$ , respectivamente,  $p < 0,05$ , n = 5) (Figura 17).

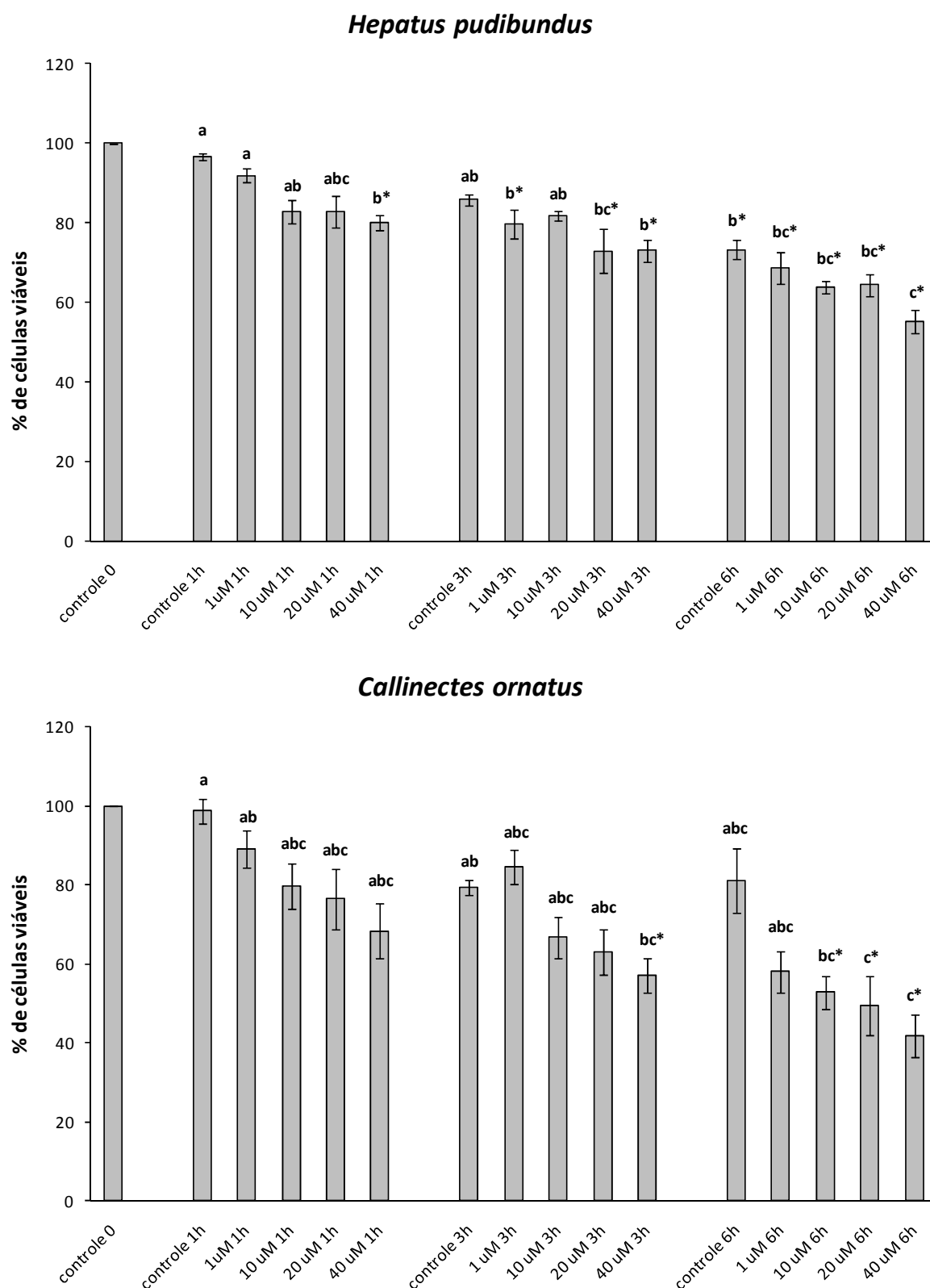


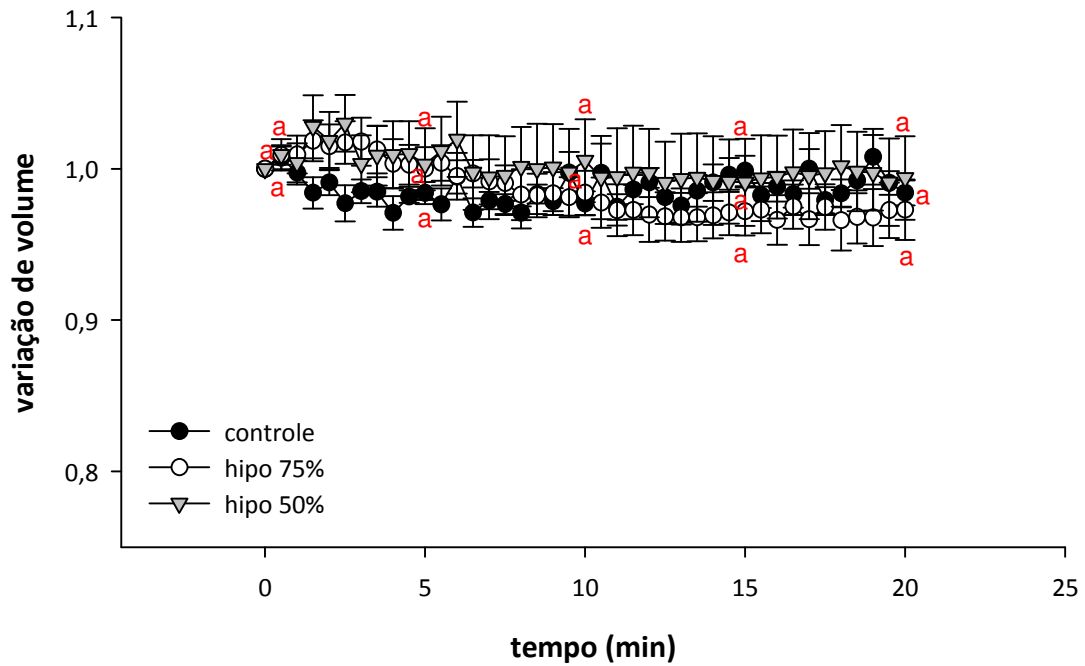
Figura 17: Viabilidade das células branquiais de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus* após exposição ao chumbo. As barras significam a porcentagem de células viáveis em relação ao controle inicial (100%). Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA seguido de Holm-Sidak method,  $p < 0,001$ ,  $n = 4$  para *H. pudibundus* e ANOVA seguido de Tukey test,  $p < 0,001$ ,  $n = 5$  para *C. ornatus*). Para uma melhor visualização dos resultados (\*) indicam onde existe diferença em relação ao controle 1h.

### 4.3 Análise da capacidade de regulação de volume celular diante de choques hiposmóticos

As células de *Hepatus pudibundus* quando expostas a dois choques hiposmóticos de diferentes intensidades – 75 e 50% do controle isosmótico – não apresentaram alteração de volume celular durante os 20 min de exposição. As células mantiveram seu volume constante durante todo o tempo experimental (Figura 18).

Entretanto, quando células branquiais de *Callinectes ornatus* foram expostas aos choques hiposmóticos de 75% e 50% houve diferença estatística somente na condição hiposmótica de 50%. Nessa condição as células apresentaram inchaço a partir de 10 minutos de exposição (controle 10'  $0,99 \pm 0,01$ ; hipo 50% 10'  $1,04 \pm 0,02$ ). O inchaço máximo atingido foi de 5%, aos 11,5 minutos de exposição e ao fim do tempo experimental (20 min) as células ainda apresentavam um inchaço de 3% (controle 20'  $1 \pm 0,02$ ; hipo 50% 20'  $1,03 \pm 0,01$ ), não sendo, portanto capazes de retornar ao seu volume inicial (Figura 18).

### *Hepatus pudibundus* - choque hiposmótico



### *Callinectes ornatus* - choque hiposmótico

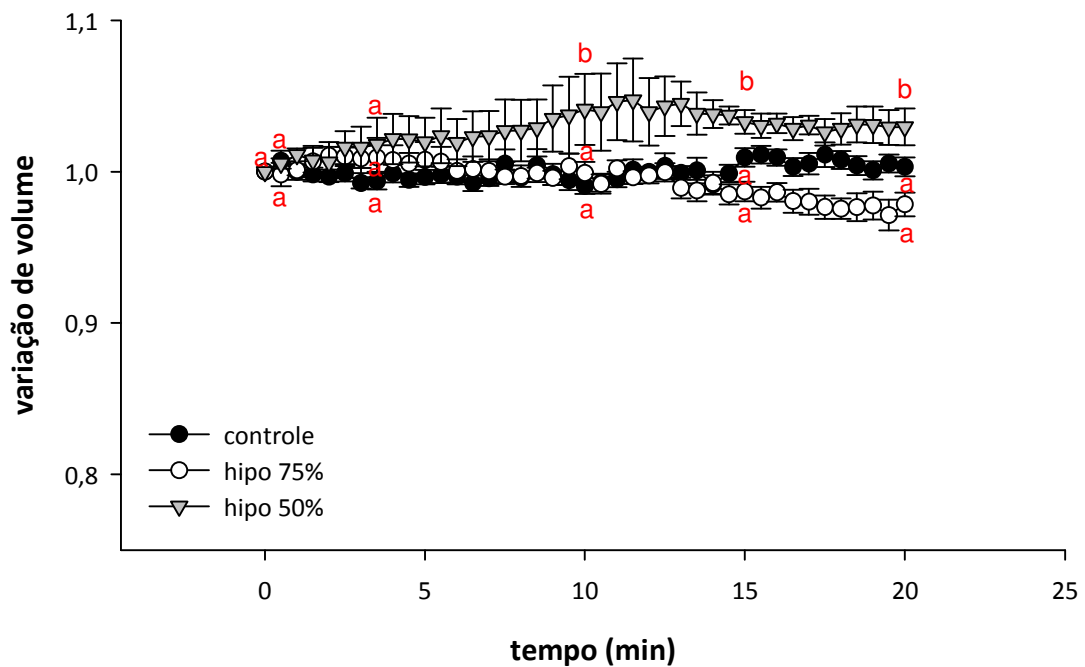


Figura 18: Variação temporal do volume de células branquiais de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus* quando expostas a choques osmóticos de diferentes intensidades (75 e 50% do controle isosmótico). Letras diferentes indicam diferença estatística (*one way ANOVA*,  $p < 0,05$ ,  $n = 5 - 13$ ).



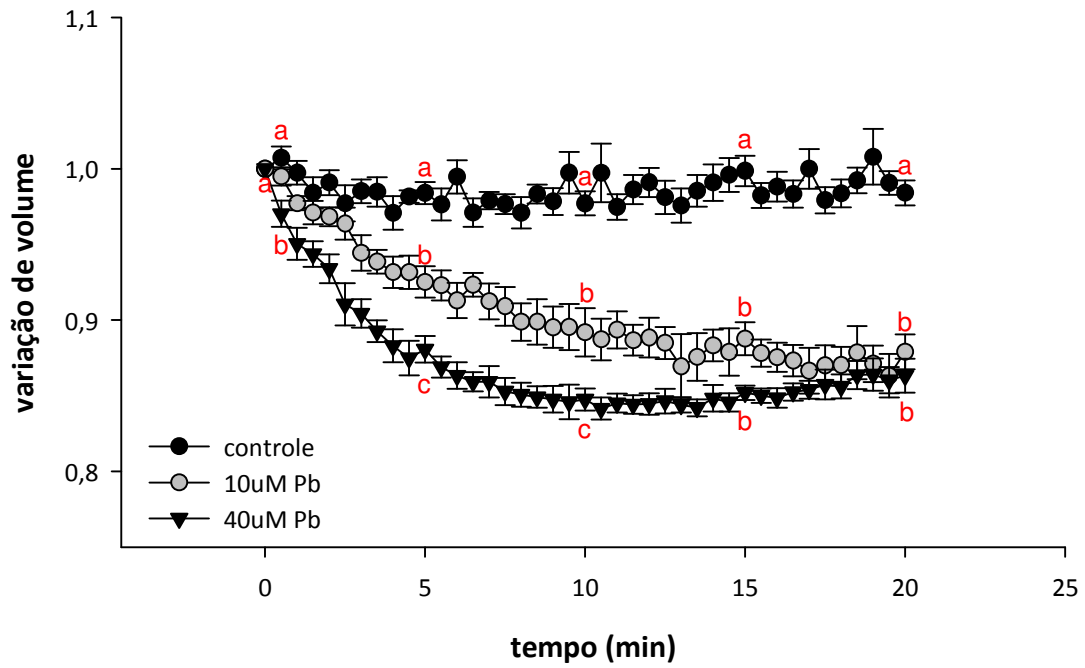
#### 4.4 Efeito do chumbo sobre a regulação de volume celular

A exposição das células branquiais de *Hepatus pudibundus* à isosmotividade associada às concentrações de 10 e 40  $\mu$ M de nitrato de chumbo resultou em redução de volume celular em ambas as concentrações. A concentração de 10  $\mu$ M ocasionou perda de volume celular detectada estatisticamente a partir do segundo tempo experimental testado, 5 minutos (controle 5'  $0,98 \pm 0,01$ ; 10  $\mu$ M Pb 5'  $0,92 \pm 0,01$ ). A partir daí as células continuaram murchando continuamente até atingir 12% de perda de volume ao fim do tempo experimental de 20 minutos (controle 20'  $0,99 \pm 0,01$ ; 10  $\mu$ M Pb 20'  $0,88 \pm 0,01$ ) (Figura 19). A concentração de 40  $\mu$ M causou praticamente a mesma perda de volume final que a concentração de 10  $\mu$ M, (controle 20'  $0,99 \pm 0,01$ ; 40  $\mu$ M Pb 20'  $0,87 \pm 0,01$ ). Entretanto, ao longo do tempo experimental, essa redução ocorreu muito mais rápido que a redução ocasionada pela concentração de 10  $\mu$ M, já em 0,5 minutos de exposição as células apresentaram 3% de redução de volume (controle 0,5'  $1 \pm 0,01$ ; 40  $\mu$ M Pb 0,5'  $0,97 \pm 0,01$ ), sendo que aos 10 minutos de exposição as células já apresentavam 15% de redução de volume (controle 10'  $0,98 \pm 0,01$ ; 40  $\mu$ M Pb 10'  $0,85 \pm 0,02$ ) e a partir de 15 minutos a redução já estava igualada com a redução encontrada na exposição à concentração de 10  $\mu$ M (Figura 19).

As células branquiais de *Callinectes ornatus*, quando expostas a duas concentrações de nitrato de chumbo sob isosmotividade, também apresentaram redução de volume celular diante de ambas as concentrações (10 e 40  $\mu$ M). A concentração de 10  $\mu$ M ocasionou a redução de volume celular a partir de cerca de 5 minutos (controle 5'  $1 \pm 0,01$ ; 10  $\mu$ M Pb 5'  $0,97 \pm 0,00$ ), sendo que as células continuaram perdendo volume até o fim do tempo experimental (controle 20'  $1 \pm 0,02$ ; 10  $\mu$ M Pb 20'  $0,90 \pm 0,02$ ), sem indicação de recuperação. A redução máxima de volume alcançada foi de 10% aos 20 minutos de exposição (Figura 19). Entretanto, na concentração de 40  $\mu$ M as células murcharam ainda mais e mais rápido. Já em 0,5 minutos de exposição as células começaram a perder volume

atingindo uma redução máxima de 16% ao fim do tempo experimental (controle 0,5'  $1 \pm 0,00$ ; 40 $\mu$ M Pb 0,5'  $0,99 \pm 0,00$  e controle 20'  $1 \pm 0,02$ ; 40 $\mu$ M Pb 20'  $0,84 \pm 0,02$ ). A partir de 15 minutos de exposição houve uma maior perda de volume na concentração de 40 $\mu$ M se comparada com a concentração de 10  $\mu$ M (10 $\mu$ M Pb 15'  $0,92 \pm 0,01$ ; 40 $\mu$ M Pb 15'  $0,85 \pm 0,02$ ) (Figura 19).

### *Hepatus pudibundus* - isosmoticidade + Pb



### *Callinectes ornatus* - isosmoticidade + Pb

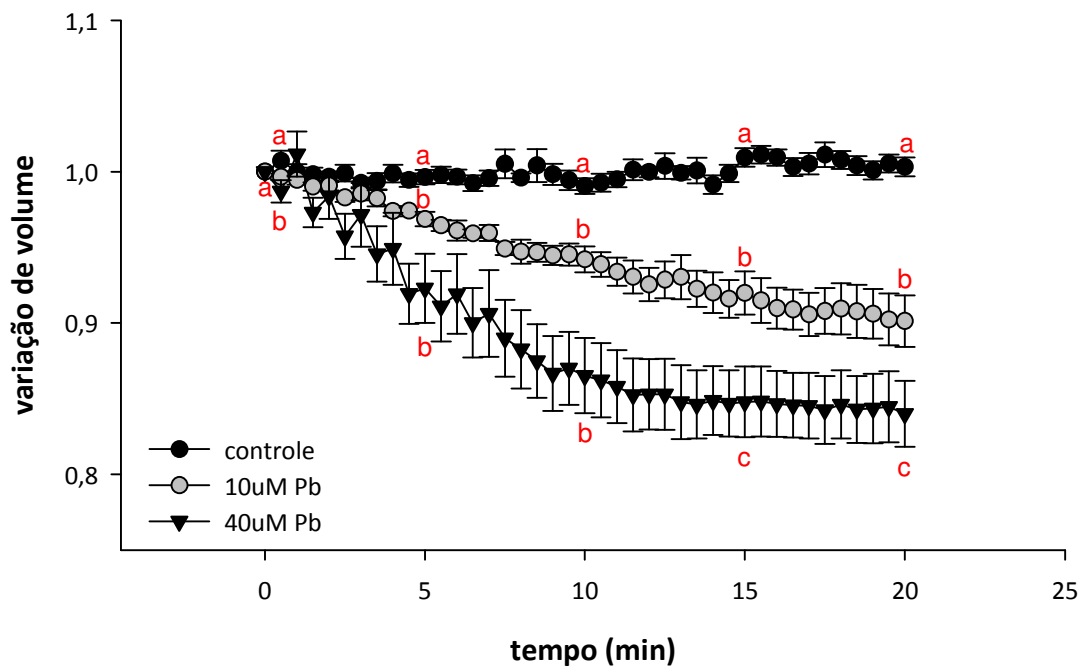
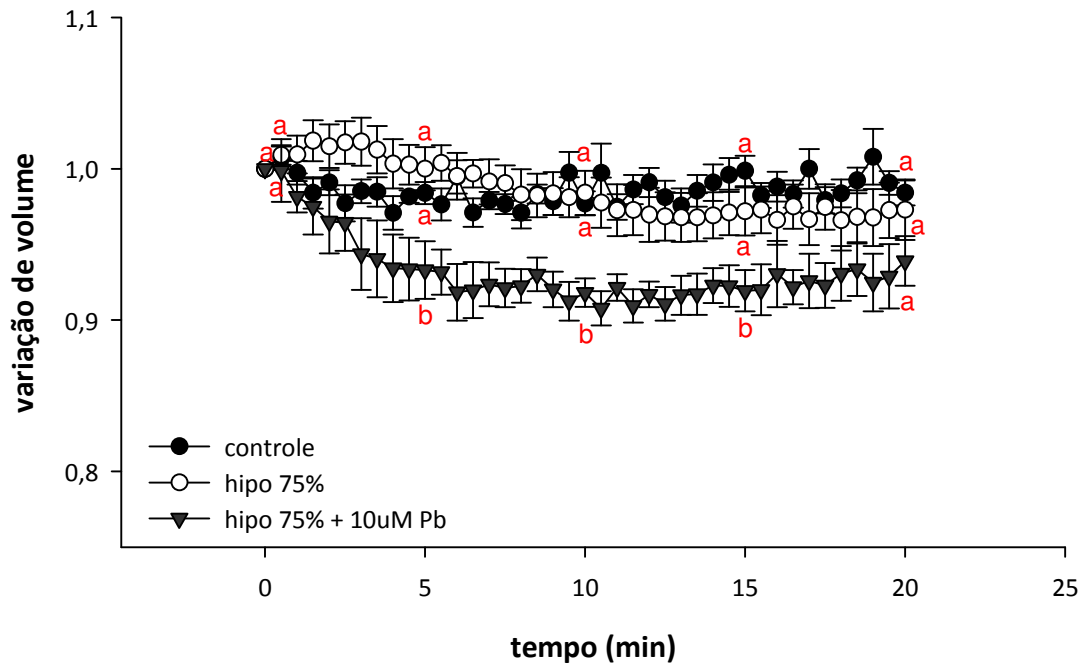


Figura 19: Variação temporal do volume de células branquiais de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus* quando expostas a duas concentrações de nitrato de chumbo (10 e 40 $\mu$ M). Letras diferentes indicam diferença estatística (one way ANOVA,  $p < 0,05$ ,  $n = 5 - 13$ ).

A exposição de células branquiais de *Hepatus pudibundus* à concentração de 10 $\mu$ M de nitrato de chumbo associada ao choque hiposmótico 75% resultou em redução de volume celular, com posterior recuperação ao fim do tempo experimental. As células começam a perder volume aos 5 minutos de exposição (controle 5' 0,98  $\pm$  0,01; hipo75% + 10 $\mu$ MPb 5' 0,93  $\pm$  0,02). Essa redução de volume foi mantida até os 15 minutos de exposição (controle 15' 1  $\pm$  0,01; hipo75% + 10 $\mu$ MPb 15' 0,92  $\pm$  0,01), quando então as células começaram a retornar ao seu volume inicial até o fim do tempo experimental, 20 minutos) (Figura 20). Essa associação do nitrato de chumbo 10 $\mu$ M ao choque hiposmótico de 75% resultou numa menor perda de volume, se comparada à exposição das células ao chumbo sob isosmoticidade. Enquanto sob isosmoticidade associada ao chumbo as células atingiram redução máxima de volume de 12% e não recuperaram o volume original, a associação ao choque hiposmótico de 75% resultou numa redução máxima de 8%, além das células terem conseguido a recuperação de volume ao fim do tempo experimental (Figura 22).

A associação do nitrato de chumbo na concentração de 10 $\mu$ M ao choque hiposmótico de 75% ocasionou perda de volume das células branquiais de *Callinectes ornatus*. A perda de volume parece ocorrer já nos primeiros minutos de exposição e a confirmação estatística ocorreu no segundo tempo experimental analisado, 5 minutos (controle 5' 1  $\pm$  0,01; hipo75% + 10 $\mu$ MPb 5' 0,90  $\pm$  0,01). Houve uma redução de volume de 10% e as células continuaram perdendo volume até o fim do tempo experimental (20 min) alcançando uma redução máxima de 17% (controle 20' 1  $\pm$  0,00; hipo75% + 10 $\mu$ MPb 20' 0,83  $\pm$  0,01) (Figura 20). Apesar de o chumbo estar associado a um choque hiposmótico, a perda de volume foi ainda maior do que quando as células foram expostas ao nitrato de chumbo 10 $\mu$ M sob isosmoticidade. Enquanto a redução máxima de volume alcançada pelas células expostas ao chumbo em condições isosmóticas foi de 10%, com a associação ao choque hiposmótico 75% essa redução de volume atingiu 17% (Figura 22).

### *Hepatus pudibundus* - choque hiposmótico 75% + Pb



### *Callinectes ornatus* - choque hiposmótico 75% + Pb

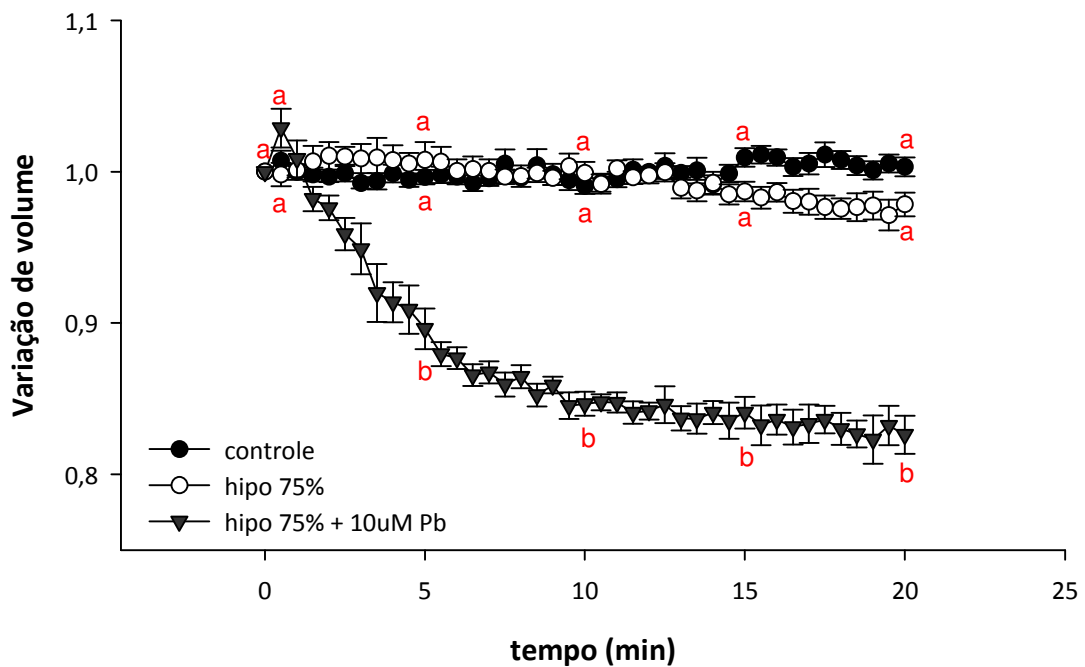


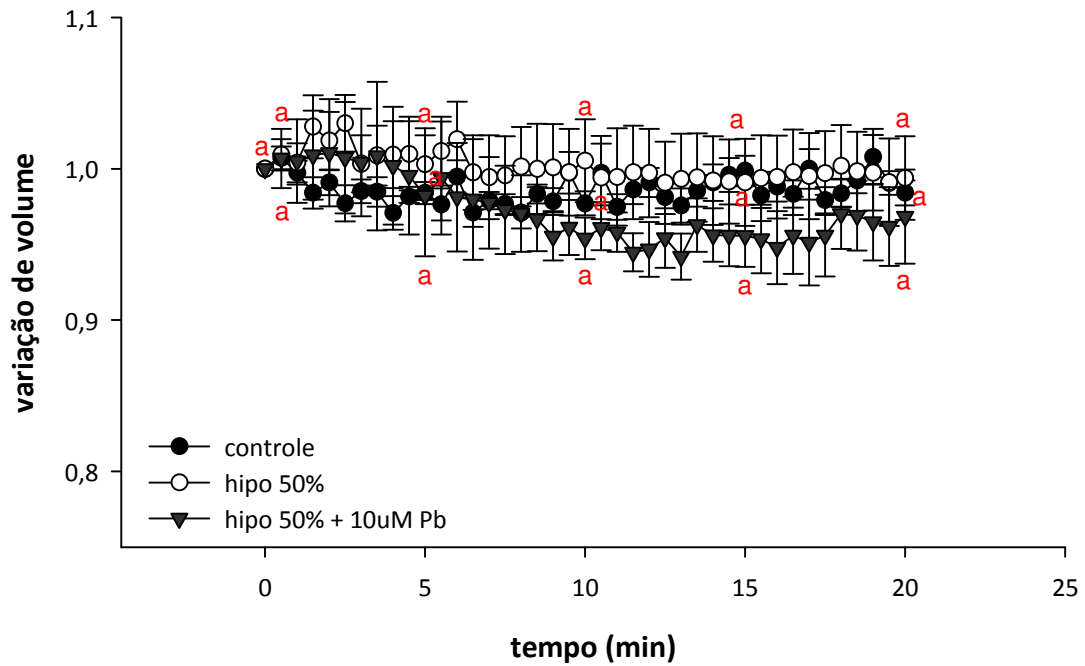
Figura 20: Variação temporal do volume de células branquiais de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus* quando expostas a concentração de 10µM de nitrato de chumbo associada ao choque hiposmótico de 75%. Letras diferentes indicam diferença estatística (*one way ANOVA*,  $p < 0,05$ ,  $n = 5 - 13$ ).

A associação do nitrato de chumbo 10 $\mu$ M a um choque hiposmótico de maior intensidade (50%) não resultou em alteração de volume nas células branquiais de *Hepatus pudibundus*. As células foram capazes de manutenção do volume celular durante todo o tempo experimental (Figura 21). Diferentemente, a exposição ao chumbo em condições isosmóticas resultou em diminuição do volume celular (Figura 22).

As células branquiais de *Callinectes ornatus* entretanto apresentaram redução de volume celular durante exposição ao chumbo 10 $\mu$ M associado ao choque hiposmótico de 50%. Aos 5 minutos de exposição as células já apresentavam redução de volume de cerca de 7% (controle 5'  $1 \pm 0,0$ ; hipo50% + 10 $\mu$ MPb 5'  $0,93 \pm 0,02$ ), sendo que as células continuaram diminuindo de volume até fim do tempo experimental, alcançando redução máxima de 16% aos 20 minutos (controle 20'  $1 \pm 0,01$ ; hipo50% + 10 $\mu$ MPb 20'  $0,84 \pm 0,01$ ) (Figura 21). Semelhante ao que aconteceu durante a associação do chumbo ao choque hiposmótico de menor intensidade (75%), a associação do nitrato de chumbo 10 $\mu$ M ao choque hiposmótico de 50% resultou numa maior redução de volume celular quando comparado com a associação de chumbo à isosmoticidade. Enquanto a redução máxima de volume atingida pelas células expostas ao chumbo em condições isosmóticas foi de 10%, com a associação ao choque hiposmótico 50% essa redução de volume foi de 16% (Figura 22).

A figura 22 concentra os resultados da exposição das células tanto em condição isosmótica como nas duas condições hiposmóticas. Esse artifício foi utilizado para uma melhor visualização do efeito do chumbo (10 $\mu$ M) sobre as células branquiais de ambas as espécies e também para a comparação do efeito do chumbo em condições isosmóticas e anisosmóticas.

### *Hepatus pudibundus* - choque hiposmótico 50% + Pb



### *Callinectes ornatus* - choque hiposmótico 50% + Pb

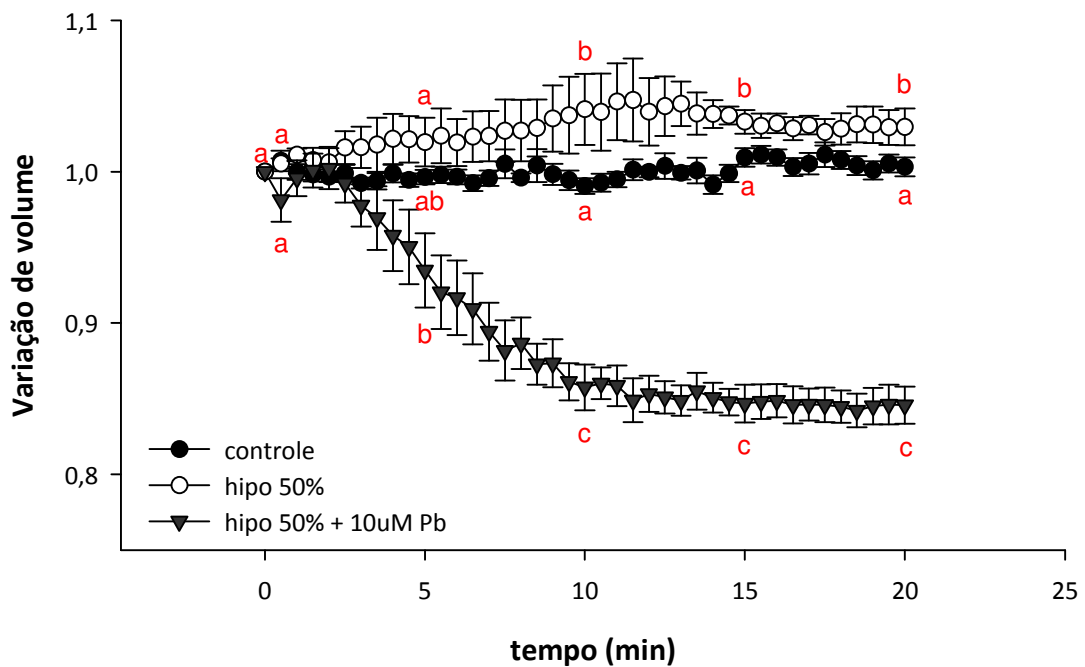


Figura 21: Variação temporal do volume de células branquiais de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus* quando expostas a concentração de 10µM de nitrato de chumbo associada ao choque hiposmótico de 50%. Letras diferentes indicam diferença estatística (*one way* ANOVA,  $p < 0,05$ ,  $n = 5 - 13$ ).

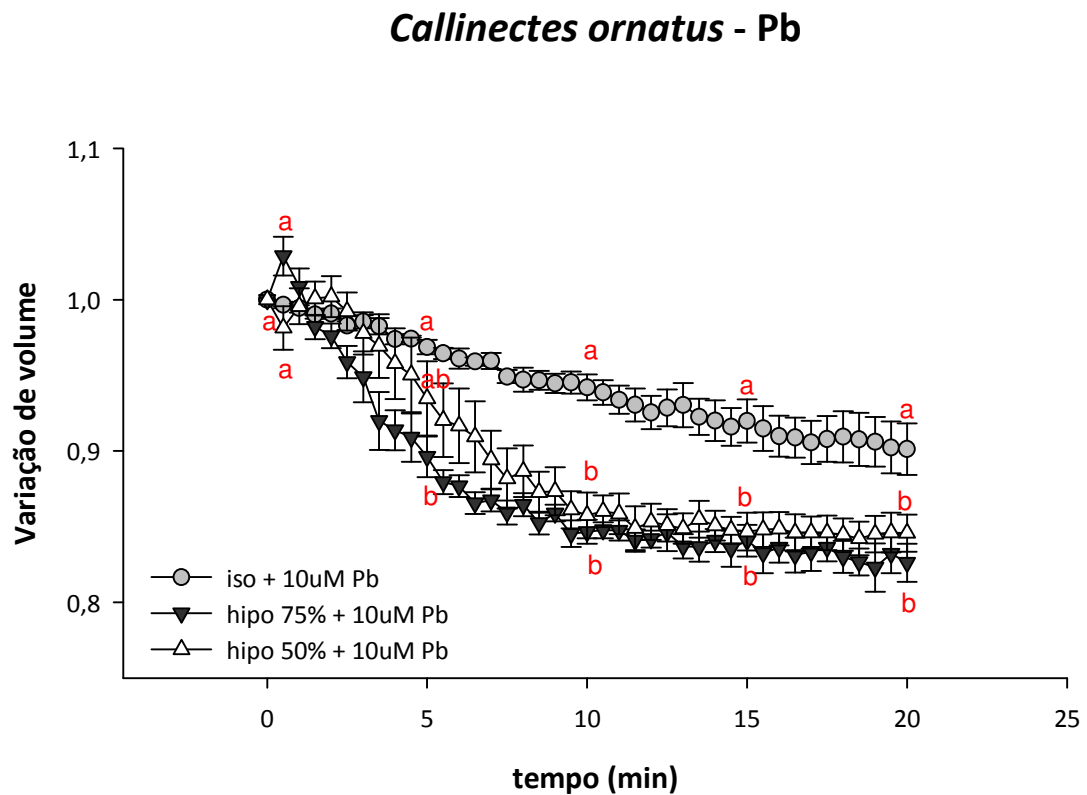
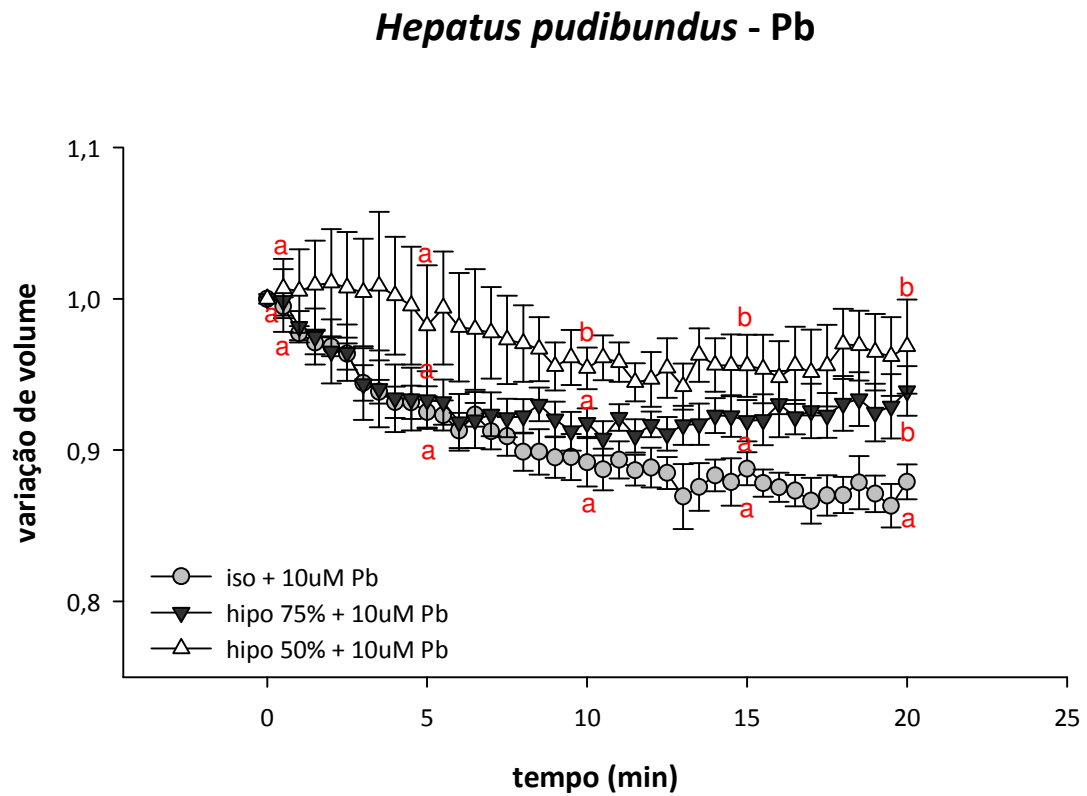


Figura 22: Resumo da variação temporal do volume de células branquiais de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus* quando expostas a concentração de 10 $\mu$ M de nitrato de chumbo sob isosmoticidade e associada ao choques hiposmóticos de 75 e 50%. Letras diferentes indicam diferença estatística (*one way* ANOVA,  $p < 0,05$ ,  $n = 5 - 13$ ).

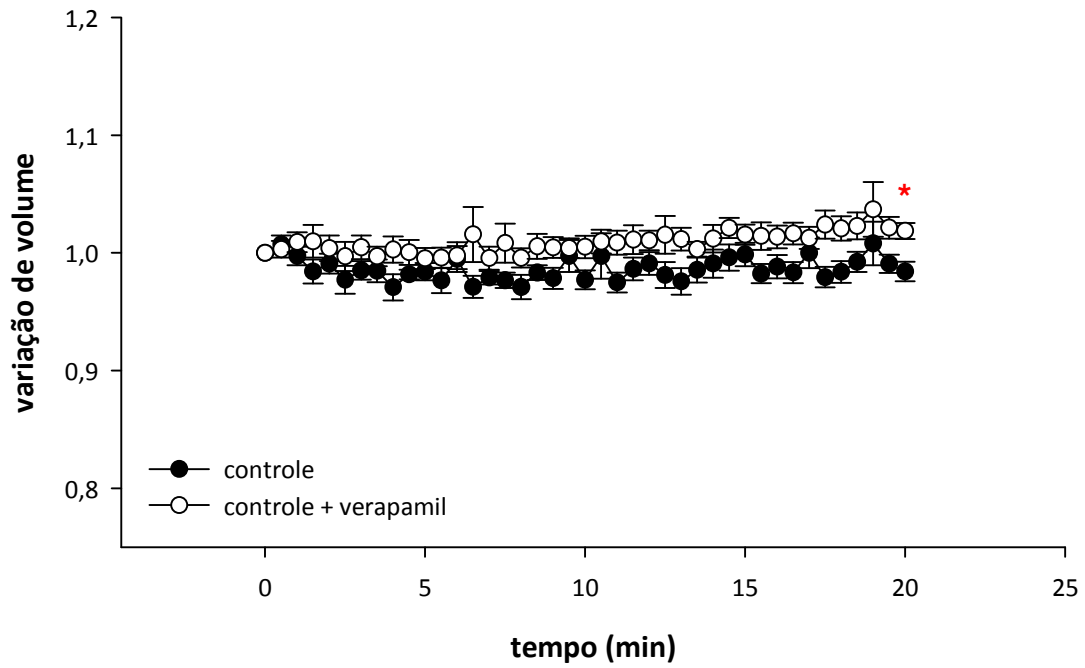


#### 4.5 Análise das possíveis vias envolvidas na regulação de volume celular

Alguns bloqueadores de vias envolvidas na regulação de volume celular e possivelmente relacionados à tomada de Pb foram analisados. Quando verapamil (inibidor de canais de  $\text{Ca}^{2+}$ ) ou ouabaína (inibidor da NaK) foram adicionados na situação controle, as células de *Hepatus pudibundus* não sofreram alteração de volume celular. As células executaram manutenção de volume celular da mesma maneira que executaram em solução isosmótica na ausência dos bloqueadores (Figuras 23 e 24).

Entretanto, células de *Callinectes ornatus* apresentaram aumento de volume celular a partir de 10 minutos de exposição tanto ao verapamil como à ouabaína, e continuaram aumentando de volume até o fim do experimento. A utilização de verapamil resultou num aumento máximo de 11% (controle 20'  $1 \pm 0,01$ ; controle + verapamil 20'  $1,11 \pm 0,03$ ) (Figura 23), e a utilização de ouabaína fez com que as células aumentassem de volume em 9% (controle 20'  $1 \pm 0,01$ ; controle + ouabaína 20'  $1,09 \pm 0,02$ ) (Figura 24).

### *Hepatus pudibundus* - iso + verapamil



### *Callinectes ornatus* - iso + verapamil

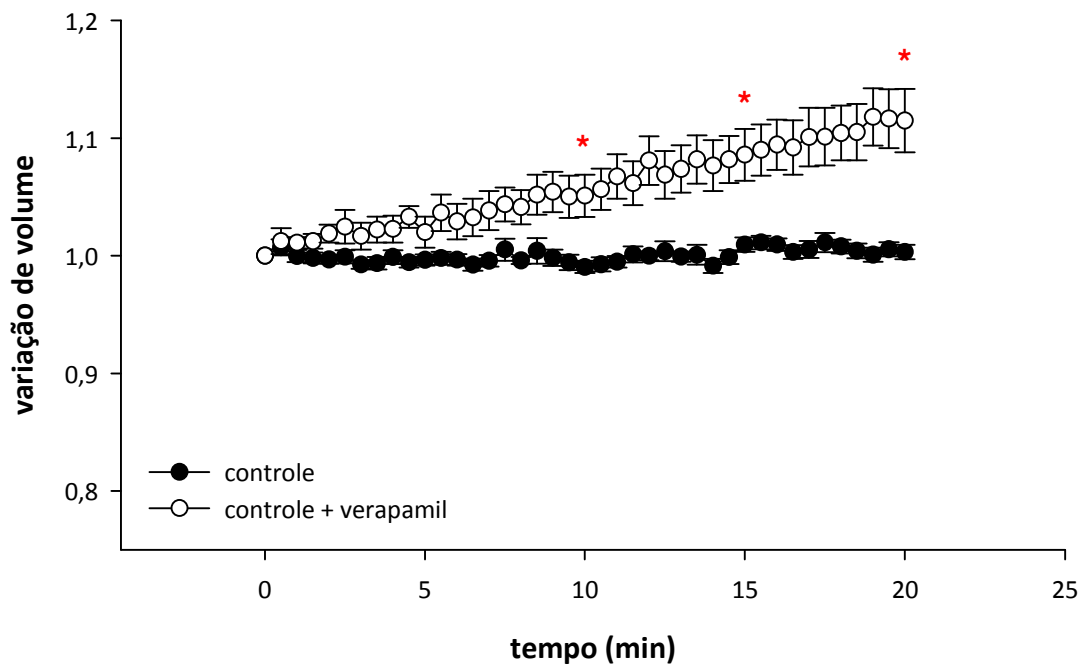


Figura 23: Variação temporal do volume de células branquiais de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus* em condição isomótica associada ao verapamil. \* indicam diferença estatística (teste t,  $p < 0,05$ ,  $n = 8 - 13$ ).

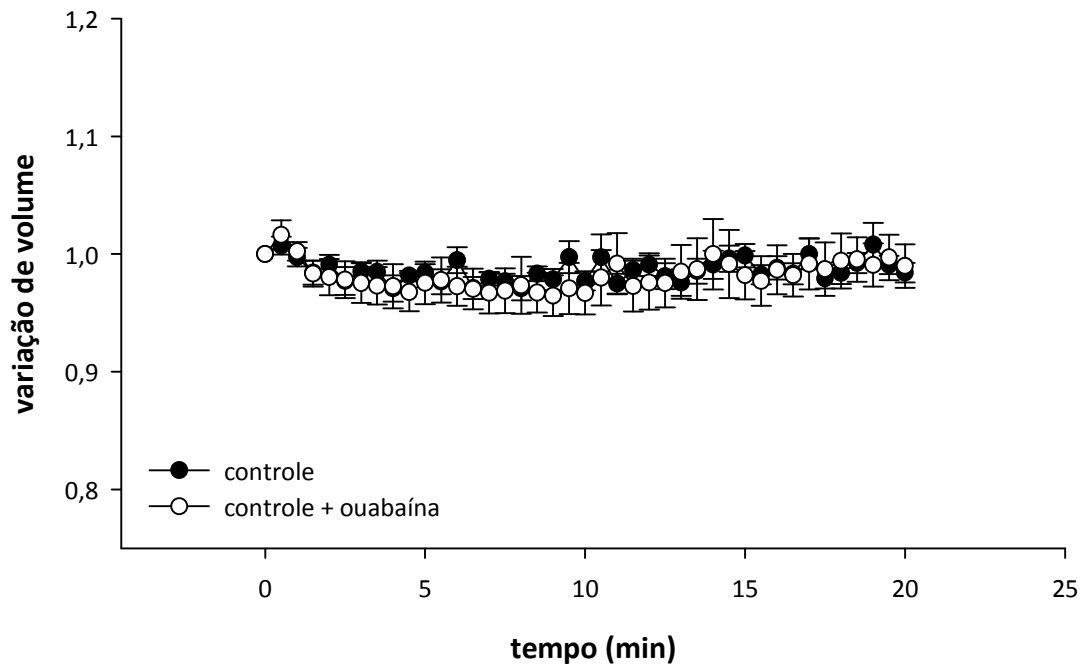
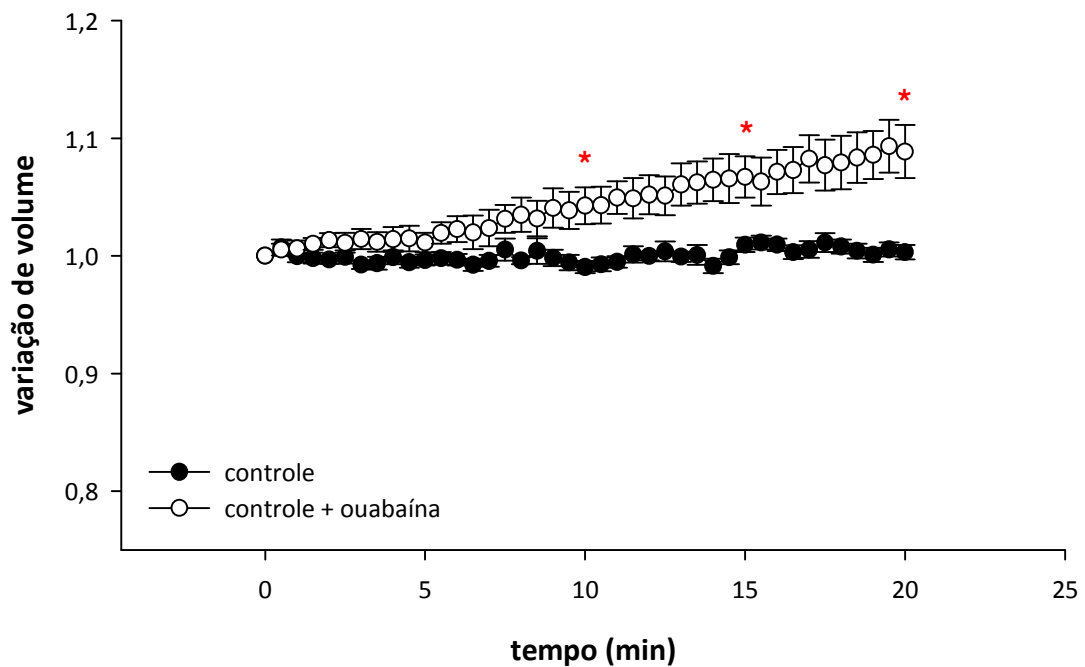
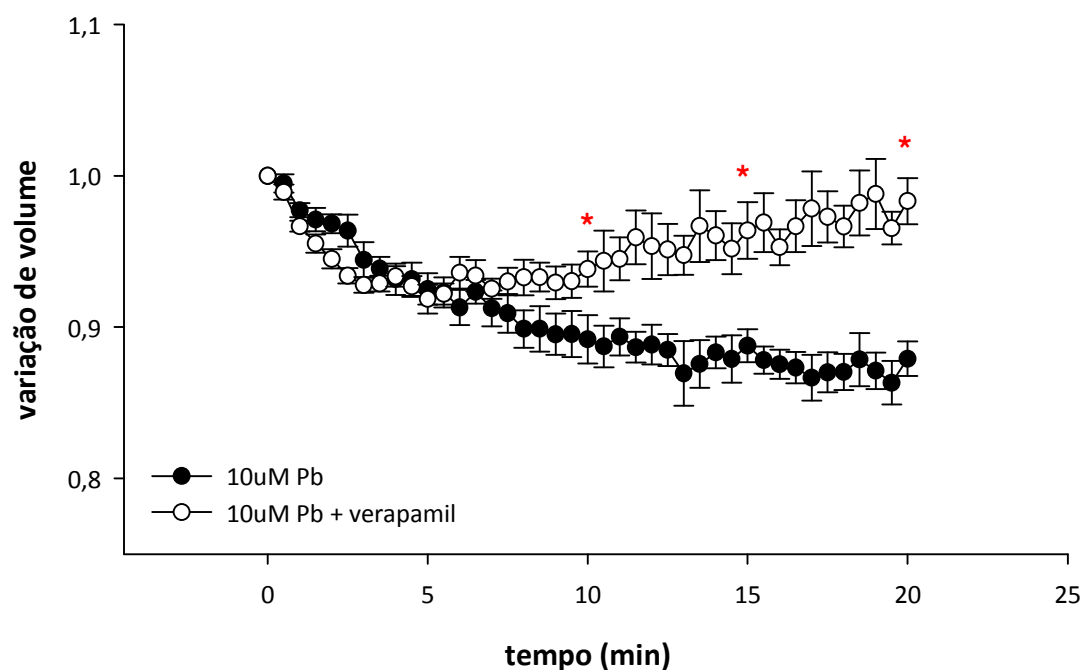
***Hepatus pudibundus* - iso + ouabaína*****Callinectes ornatus* - iso + ouabaína**

Figura 24: Variação temporal do volume de células branquiais de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus* em condição isomótica associada à ouabaína.\* indicam diferença estatística (*teste t*,  $p < 0,05$ ,  $n = 8 - 13$ ).

A exposição das células branquiais de *Hepatus pudibundus* à solução isosmótica 10 $\mu$ M Pb associada aos bloqueadores resultou em diferença estatística apenas na presença de verapamil quando comparado à redução de volume alcançada pelas células durante a exposição ao chumbo sem os inibidores. Nos minutos iniciais a redução de volume foi praticamente a mesma, entretanto a partir de 10 minutos as células começaram a recuperar volume. Ao fim do tempo experimental as células praticamente retornaram ao seu volume inicial ( $0,98 \pm 0,01$ ), condição não observada na ausência de verapamil (Figura 25).

Entretanto, a exposição das células branquiais de *Callinectes ornatus* à solução isosmótica 10 $\mu$ M Pb associada ao verapamil resultou inicialmente numa redução de volume ainda maior do que a encontrada sem a presença de verapamil. Aos 5 e 10 minutos de exposição as células murcharam cerca de 10% na presença de verapamil ( $0,90 \pm 0,01$ ;  $0,89 \pm 0,01$ ) enquanto sem o inibidor a redução de volume encontrada nesse período foi de 3 a 6% ( $0,97 \pm 0,00$ ;  $0,94 \pm 0,01$ ) (Figura 25). A presença de ouabaína resultou em diferença estatística somente aos 20 minutos de exposição, as células murcharam menos. Com ouabaína a redução de volume foi de 4% ( $0,96 \pm 0,02$ ), sem ouabaína foi de 10% ( $0,90 \pm 0,01$ ) (Figura 26).

### *Hepatus pudibundus* - Pb + verapamil



### *Callinectes ornatus* - Pb + verapamil

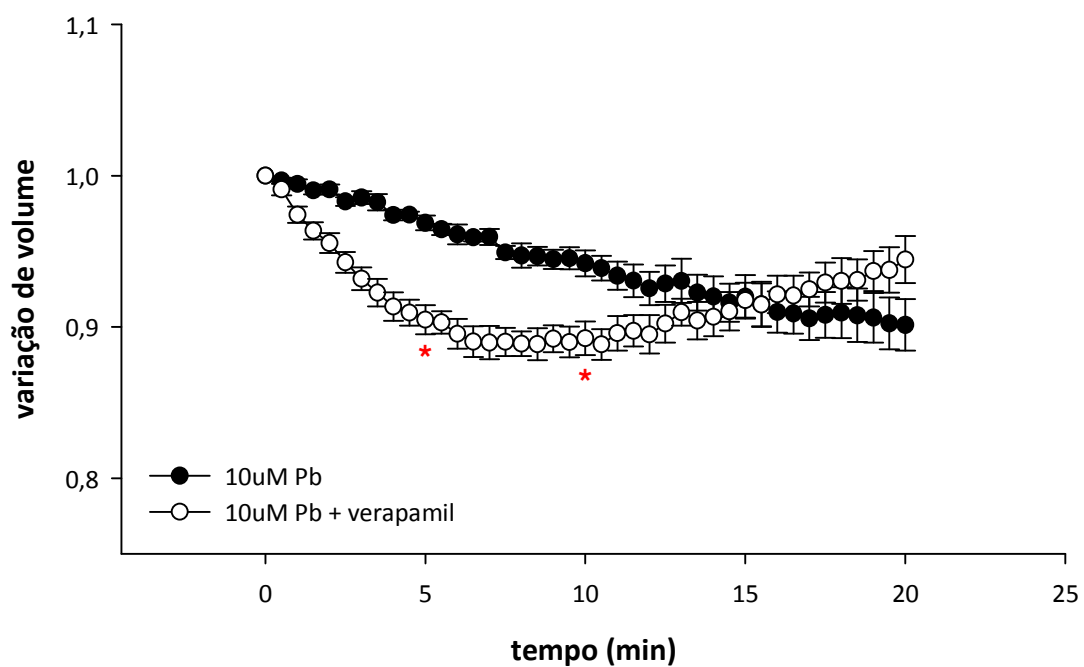
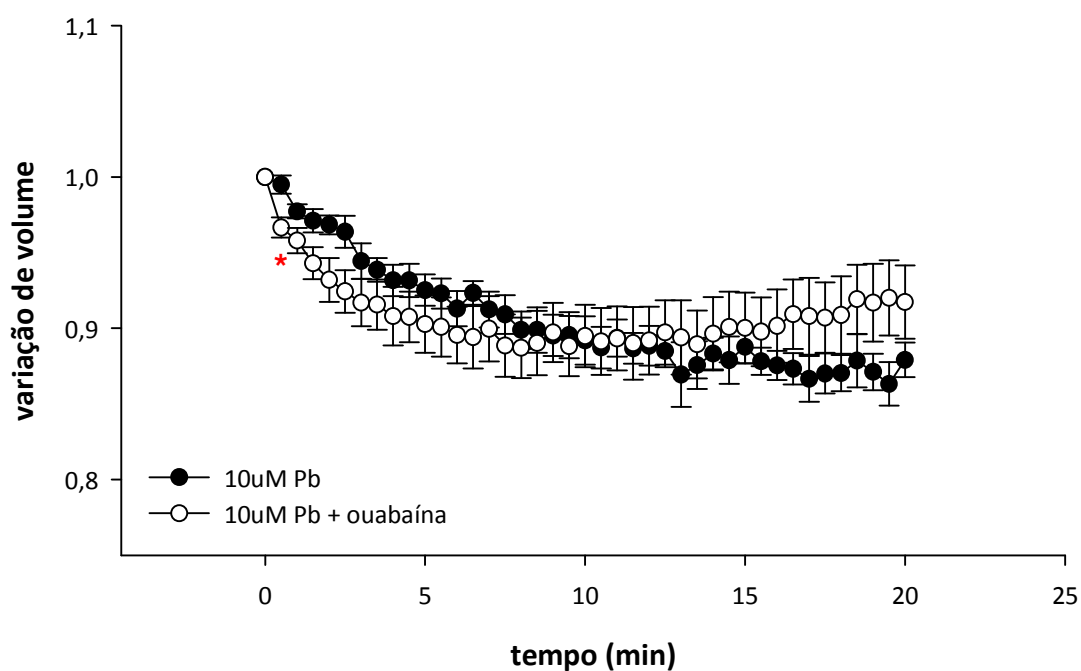


Figura 25: Variação temporal do volume de células branquiais de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus* durante exposição ao chumbo associado ao verapamil. \* indicam diferença estatística (teste *t*,  $p < 0,05$ ,  $n = 5 - 8$ ).

### *Hepatus pudibundus* - Pb + ouabaína



### *Callinectes ornatus* - Pb + ouabaína

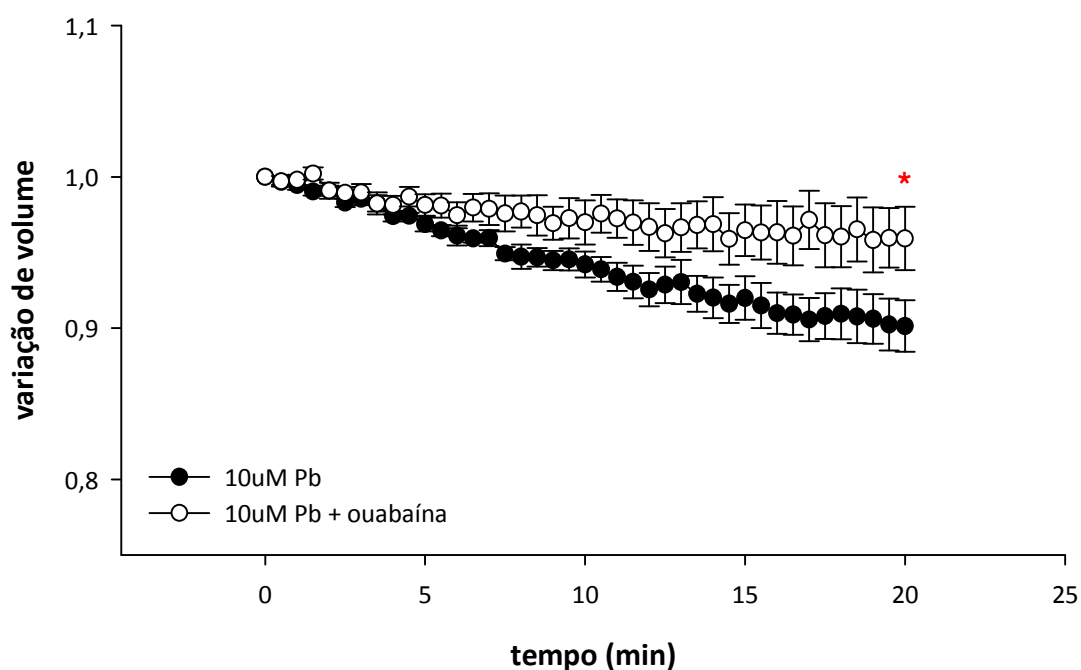
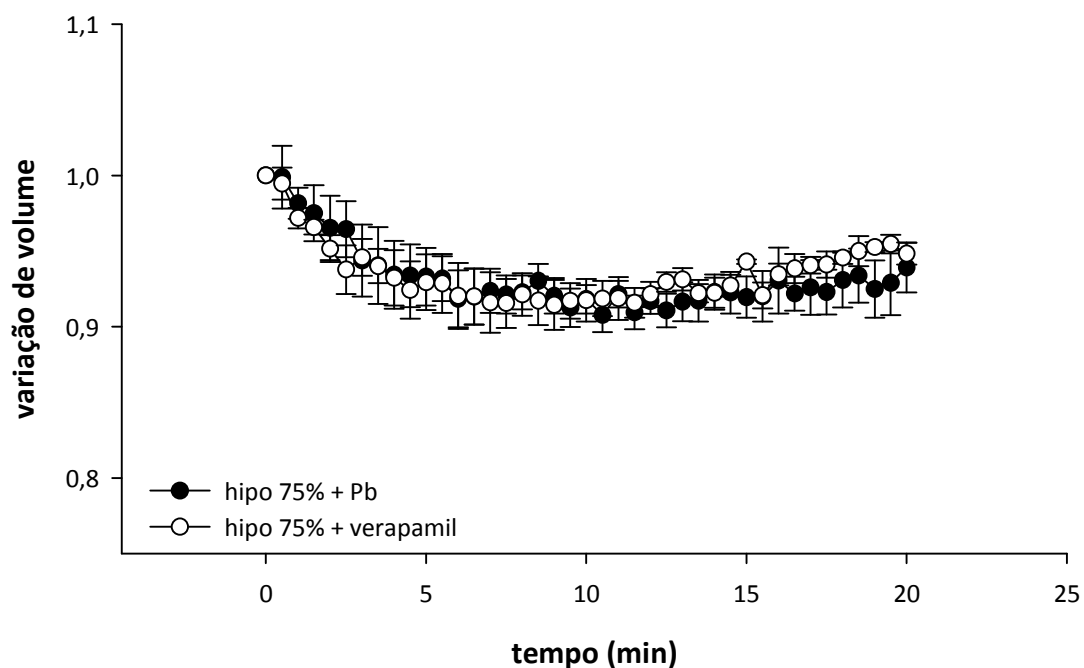


Figura 26: Variação temporal do volume de células branquiais de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus* durante exposição ao chumbo associado à ouabaína. \* indicam diferença estatística (*teste t*,  $p < 0,05$ ,  $n = 5 - 8$ ).

Quando o inibidor verapamil foi adicionado na exposição de células braquiais de *Hepatus pudibundus* ao choque hiposmótico associado com chumbo não houve alteração no padrão de regulação de volume apresentado anteriormente (Figura 27). Já a adição de ouabaína resultou numa grande redução de volume celular. Se anteriormente as células conseguiram conter a redução de volume ocasionada pelo chumbo, aqui com a presença de ouabaína as células começaram a se diferenciar da exposição anterior aos 10 minutos e atingiram uma redução máxima de volume 20% aos 20 minutos de exposição ( $0,80 \pm 0,02$ ) (Figura 28). Essa redução de 20% foi ainda maior do que quando as células foram expostas somente ao chumbo (12%), sem o choque osmótico ( $10\mu\text{M Pb } 20' 0,88 \pm 0,01$ ; hipo 75% + Pb + ouab 20'  $0,80 \pm 0,02$ ).

Já as células branquiais de *Callinectes ornatus* apresentaram uma menor redução de volume celular na presença de ambos os inibidores. Se na ausência dos inibidores as células murcharam ao fim do experimento cerca de 18%, aqui a redução alcançada na presença de verapamil foi 5% ( $0,95 \pm 0,02$ ), e na presença de ouabaína foi de 6% ( $0,94 \pm 0,03$ ) (Figuras 27 e 28).

### *Hepatus pudibundus* - hipo + Pb + verapamil



### *Callinectes ornatus* - hipo + Pb + verapamil

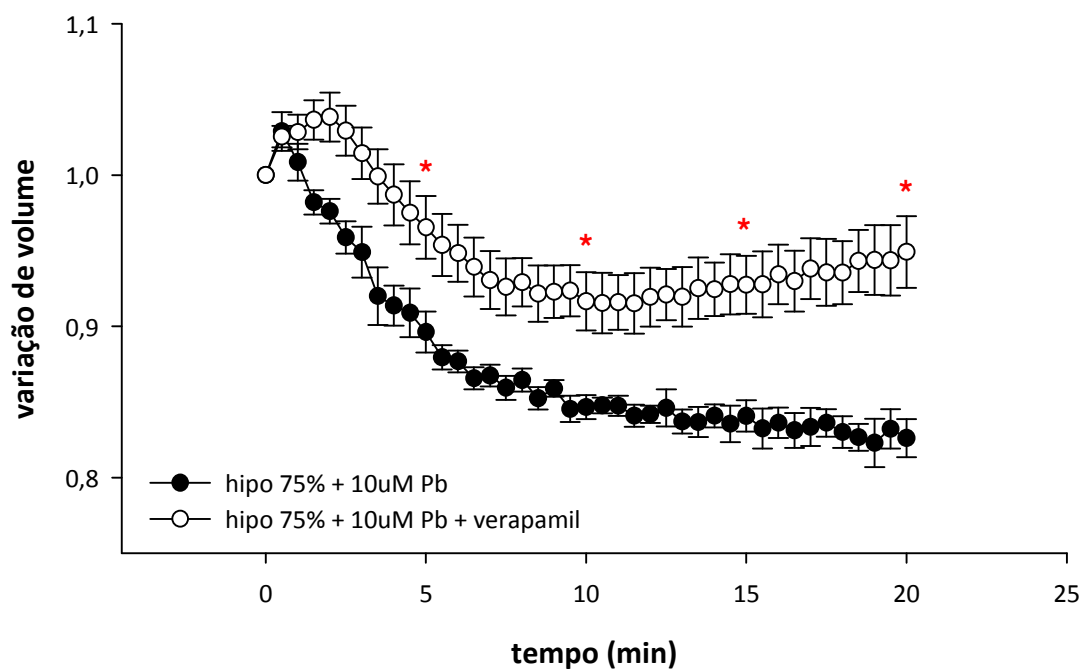
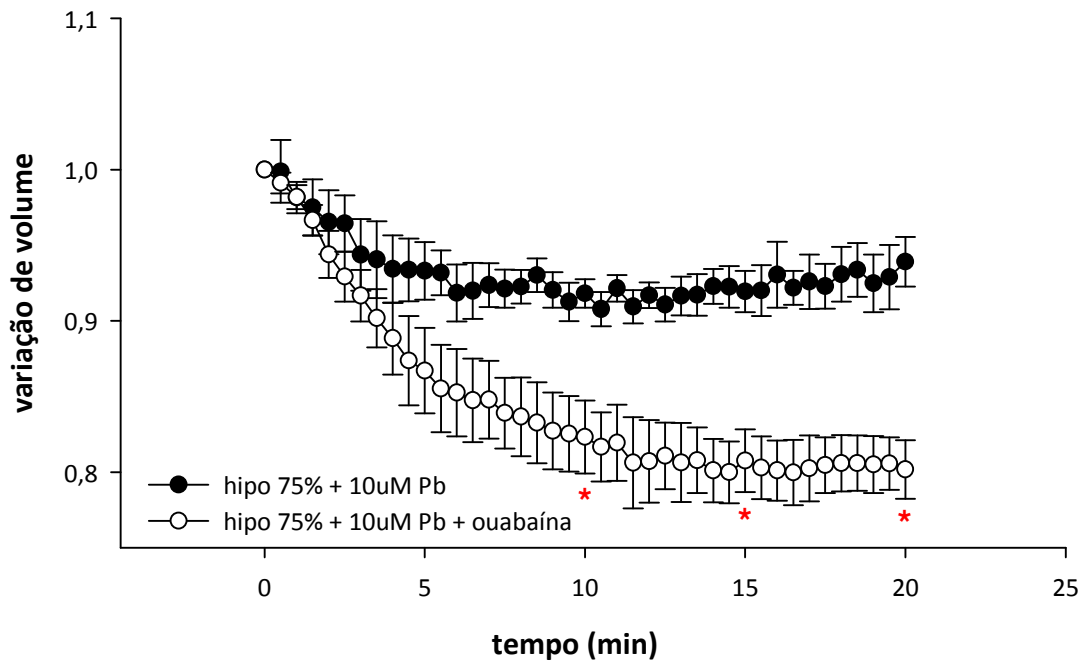


Figura 27: Variação temporal do volume de células branquiais de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus* durante exposição ao chumbo associado a um choque hiposmótico e na presença de verapamil. \* indicam diferença estatística (*teste t*,  $p < 0,05$ ,  $n = 5 - 8$ ).



### *Hepatus pudibundus* - hipo + Pb + ouabaína



### *Callinectes ornatus* - hipo + Pb + ouabaína

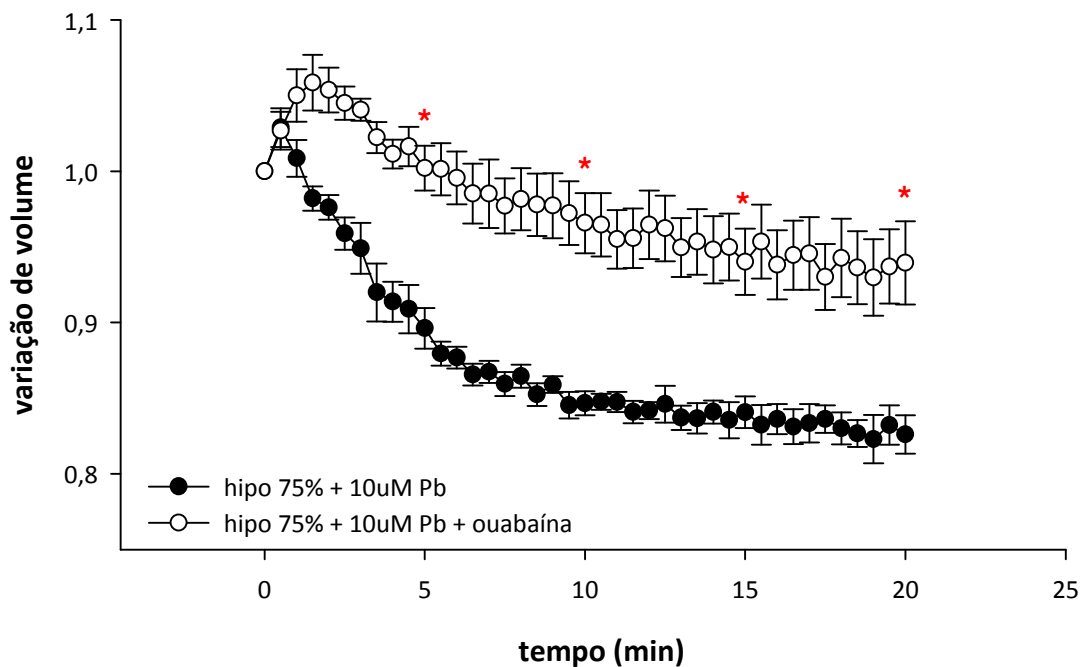


Figura 28: Variação temporal do volume de células branquiais de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus* durante exposição ao chumbo associado a um choque hiposmótico e na presença de ouabaína. \* indicam diferença estatística (*teste t*,  $p < 0,05$ ,  $n = 5 - 8$ ).

#### **4.6 A participação de aquaporinas na regulação de volume das células branquiais de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus***

Após a análise da participação de vias iônicas na regulação do volume celular e do efeito do chumbo sobre as mesmas, começou a ser analisada a participação de canais de água, as aquaporinas, na regulação de volume celular. Como inibidor das aquaporinas foi utilizado cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) na concentração de  $100\mu\text{M}$  (Marineli *et al*, 1997; Meinild *et al*, 1998; Belyantseva *et al*, 2000; Watanabe *et al*, 2005). Os resultados apresentados aqui são preliminares, pois estão com tamanho amostral baixo.

Em seguida, as figuras 32 e 33 fornecem um resumo da alteração de volume final (20 minutos) encontrada em todas as condições analisadas em que foram utilizados inibidores.

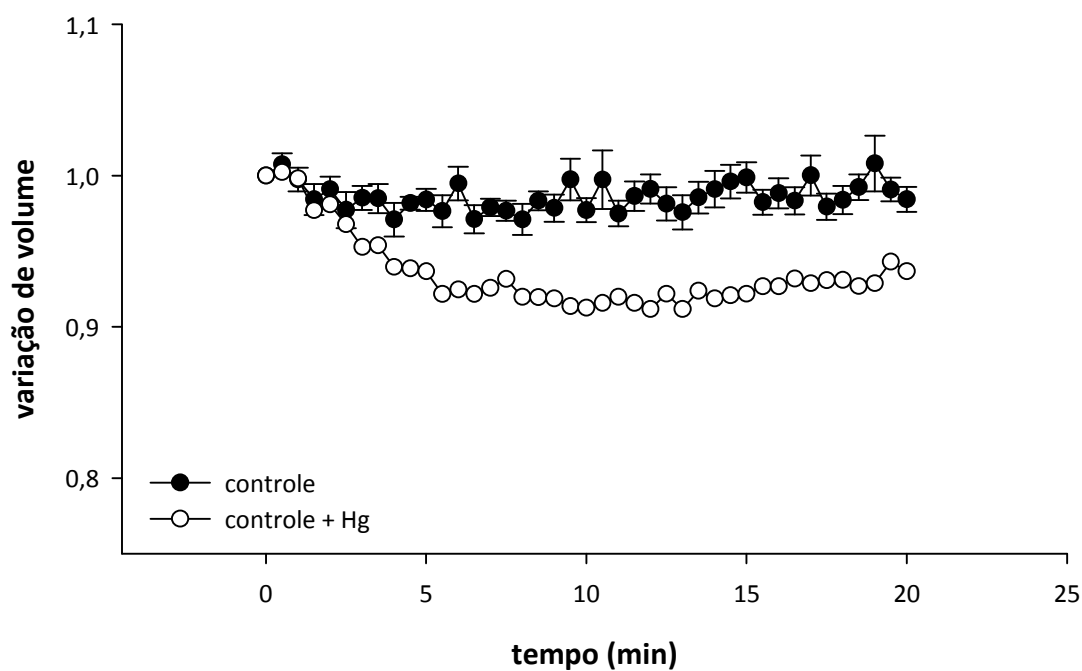
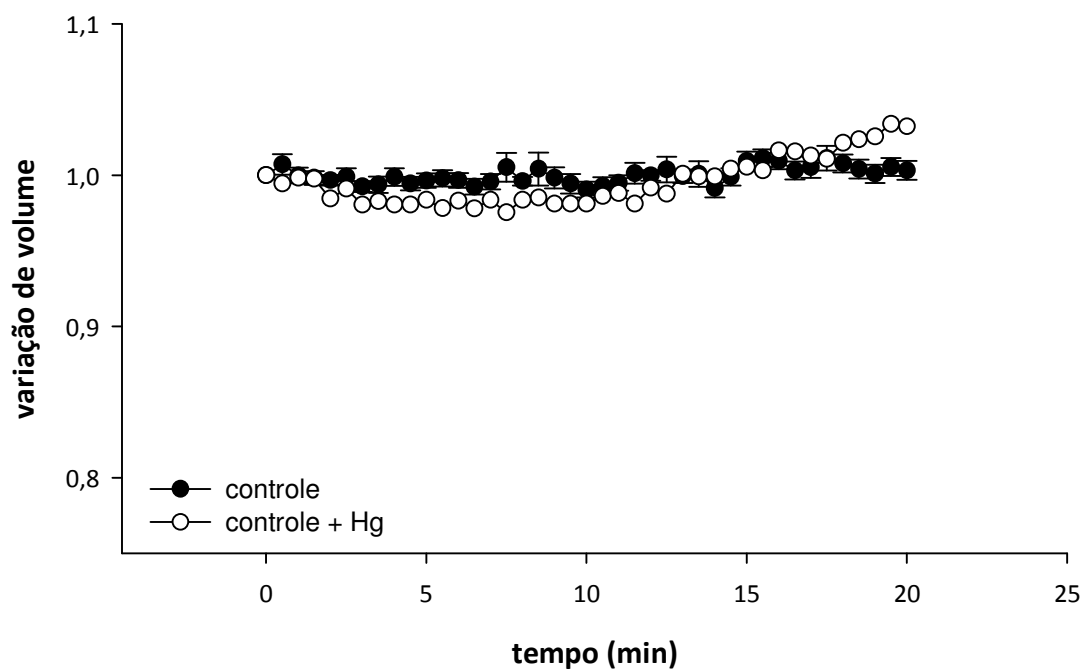
***Hepatus pudibundus* - iso + HgCl<sub>2</sub>*****Callinectes ornatus* - iso + HgCl<sub>2</sub>**

Figura 29: Variação temporal do volume de células branquiais de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus* em condição isosmótica associada ao HgCl<sub>2</sub>.

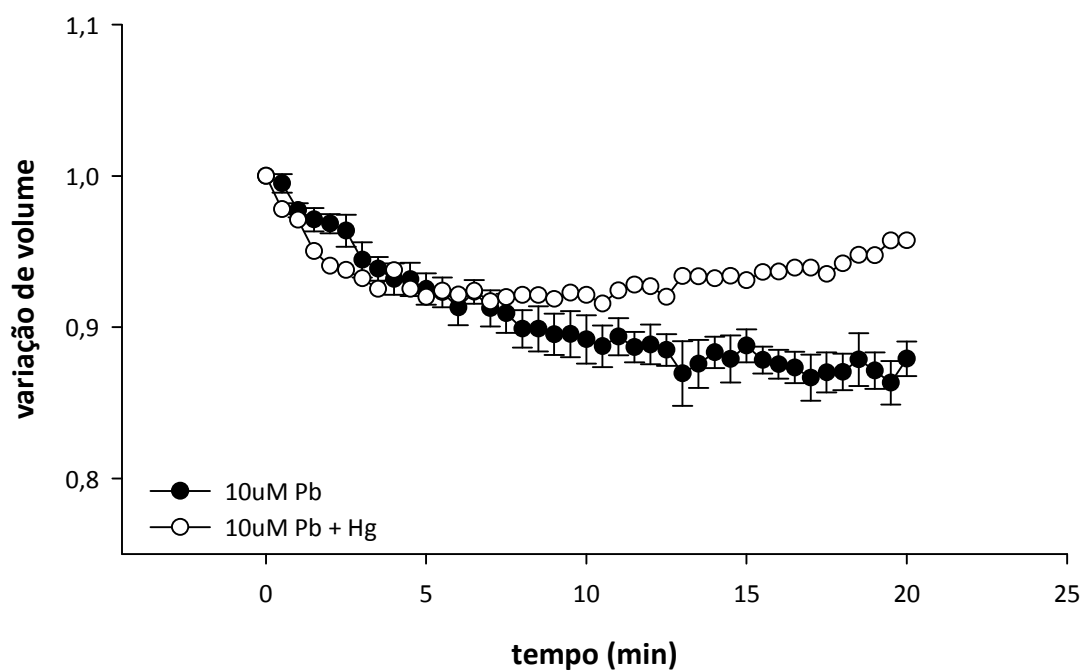
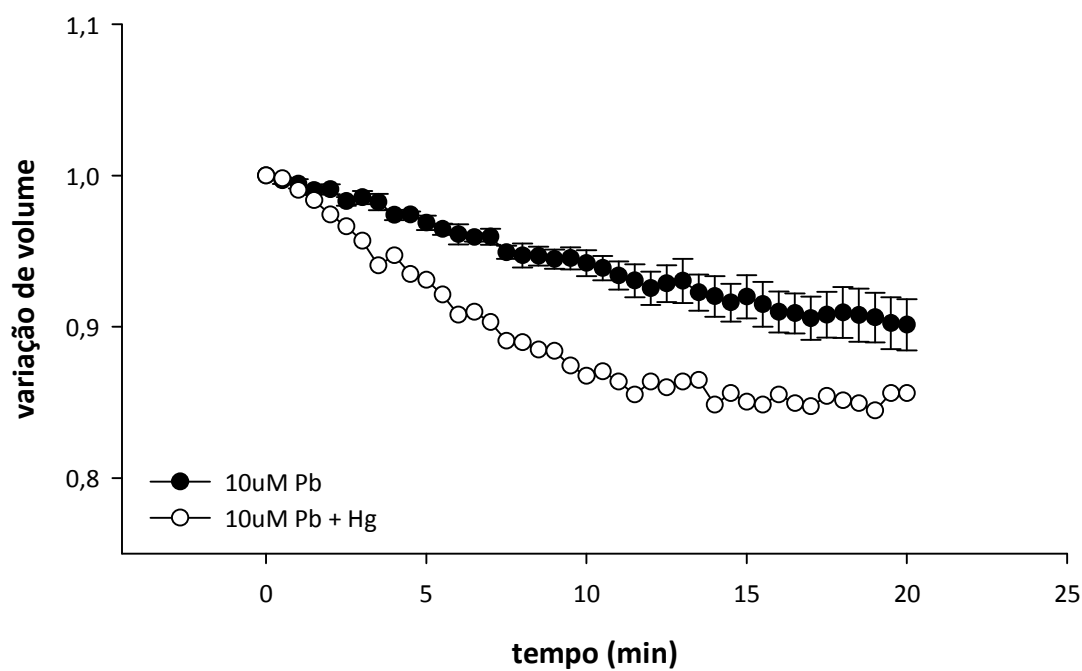
***Hepatus pudibundus* - Pb + HgCl<sub>2</sub>*****Callinectes ornatus* - Pb + HgCl<sub>2</sub>**

Figura 30: Variação temporal do volume de células branquiais de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus* durante exposição ao chumbo associado ao HgCl<sub>2</sub>.

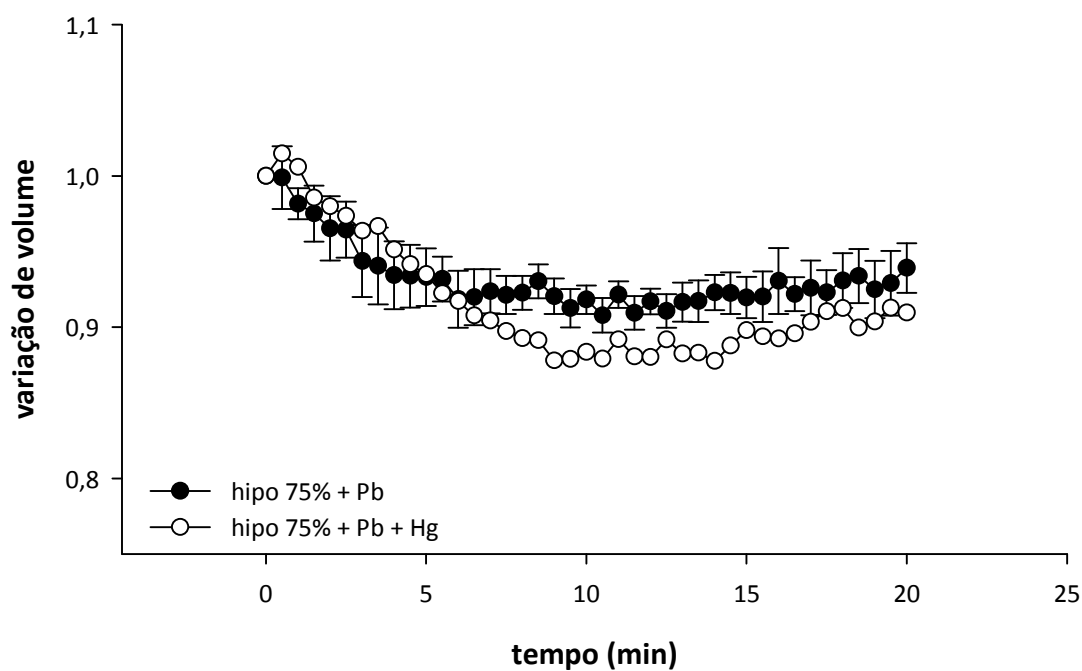
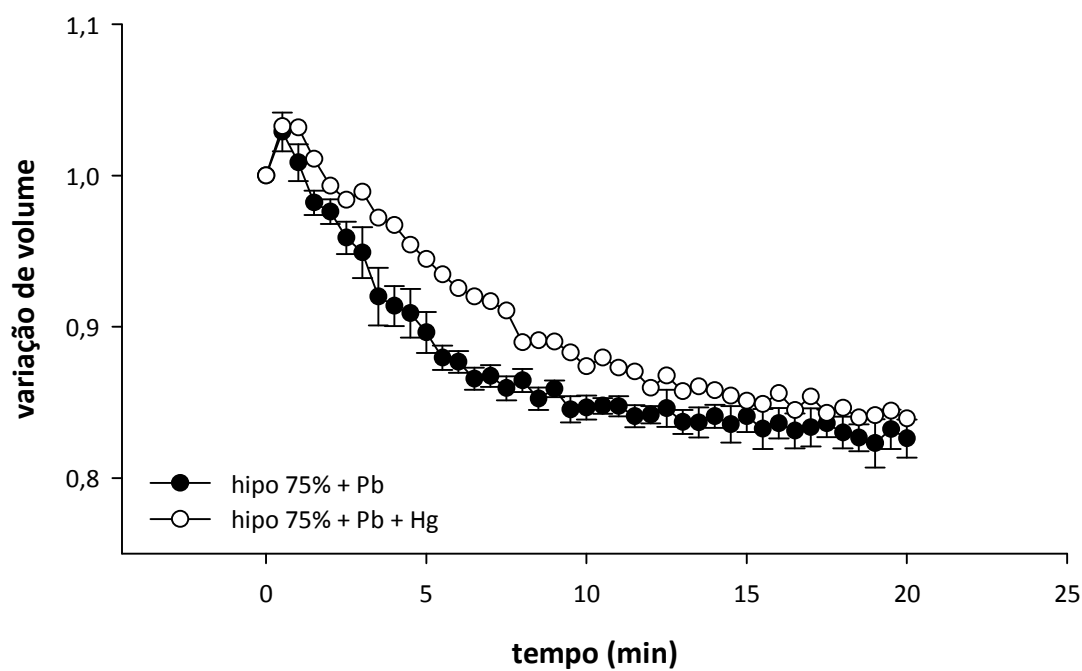
***Hepatus pudibundus* - Hipo + Pb + HgCl<sub>2</sub>*****Callinectes ornatus* - hipo + Pb + HgCl<sub>2</sub>**

Figura 31: Variação temporal do volume de células branquiais de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus* durante exposição ao chumbo associado a um choque hiposmótico e na presença de HgCl<sub>2</sub>.

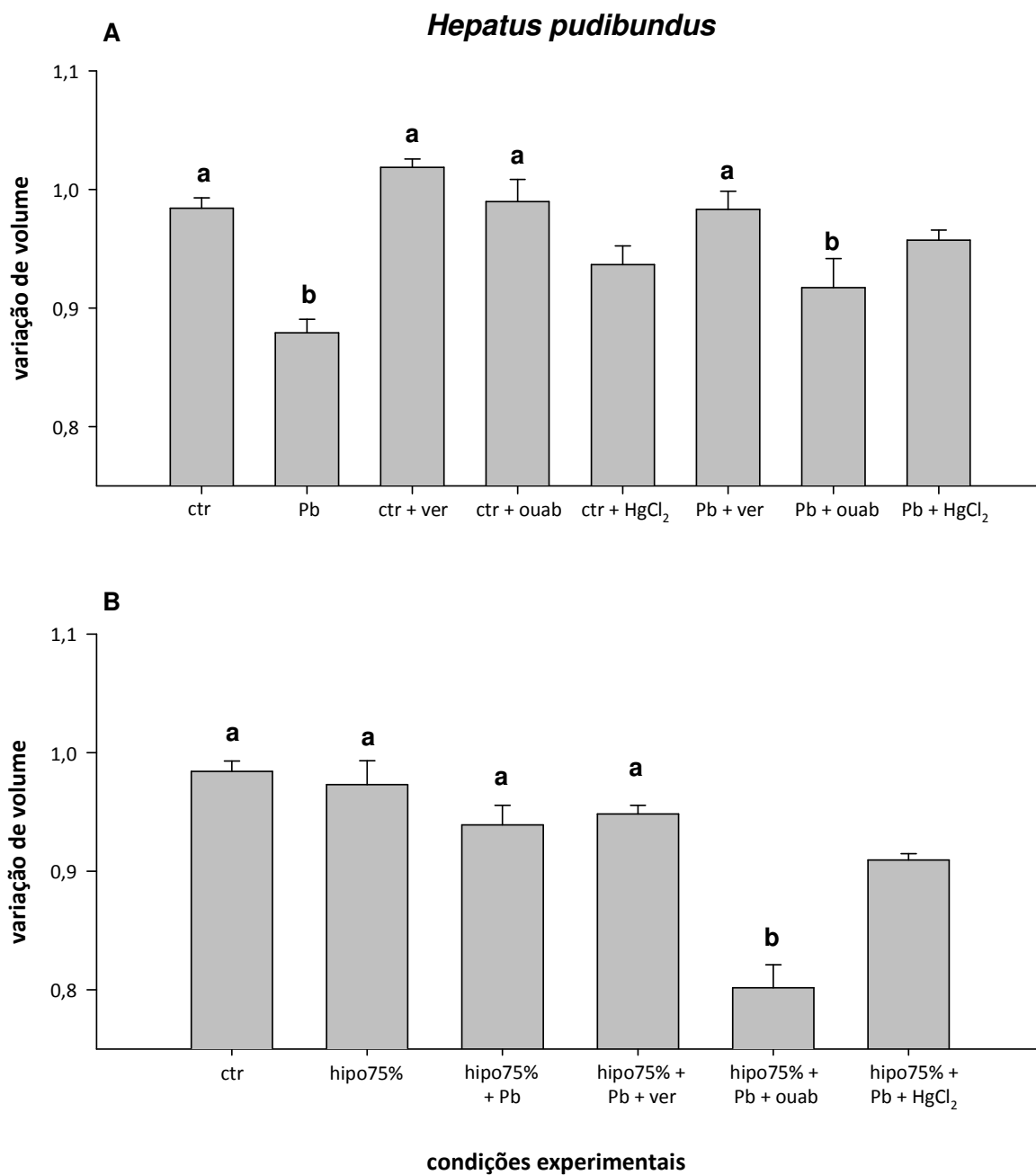


Figura 32: Resumo da variação de volume encontrada após 20 minutos de exposição das células branquiais de *Hepatus pudibundus* às condições experimentais em que foram usados inibidores. (A) condições isosmóticas e (B) condições hiposmóticas. Letras diferentes significam diferença estatística (one way ANOVA,  $p < 0,05$ ). Os dados de HgCl<sub>2</sub> são preliminares e não sofreram tratamento estatístico pelo número amostral reduzido.

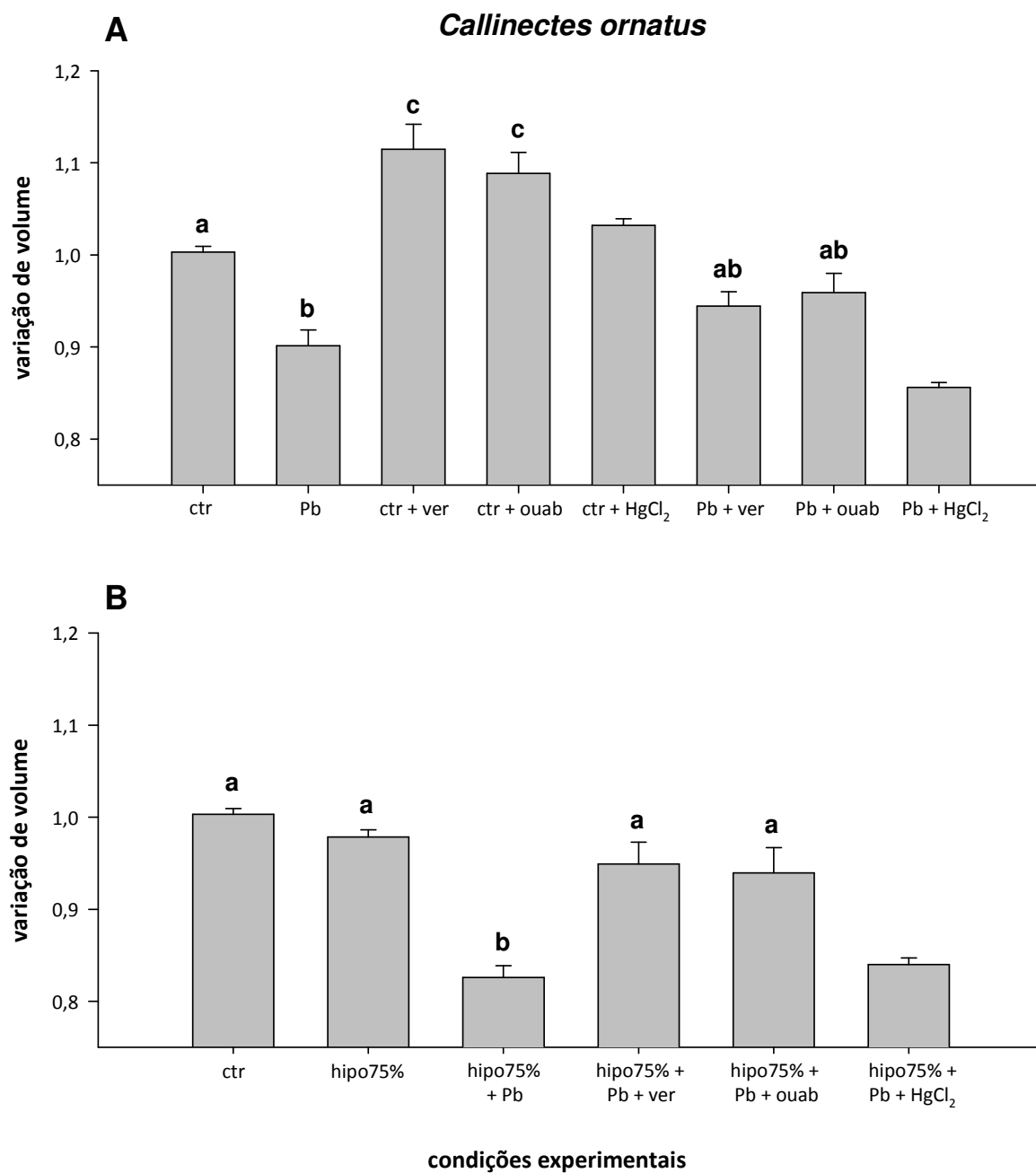


Figura 33: Resumo da variação de volume encontrada após 20 minutos de exposição das células branquiais de *Callinectes ornaus* às condições experimentais em que foram usados inibidores. (A) condições isosmóticas e (B) condições hiposmóticas. Letras diferentes significam diferença estatística (one way ANOVA,  $p < 0,05$ ). Os dados de HgCl<sub>2</sub> são preliminares e não sofreram tratamento estatístico pelo número amostral reduzido.

## 5 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Quando células branquiais recém-dissociadas foram submetidas a um teste de viabilidade celular observou-se que a toxicidade do chumbo sobre essas células de ambas as espécies é dose- e tempo-dependente. As células branquiais de *Hepatus pudibundus* parecem ser mais sensíveis tanto às concentrações de chumbo, como ao tempo de exposição se comparadas com as células de *Callinectes ornatus*. Enquanto as células de *Hepatus pudibundus* perdem viabilidade já após 1 hora de exposição à concentração mais alta de nitrato de chumbo (40 $\mu$ M), as células de *Callinectes ornatus* só perdem viabilidade após exposição a essa mesma concentração por 3 horas. Após 3 horas de exposição, praticamente todas as concentrações de chumbo são tóxicas para as células de *Hepatus pudibundus*. Para ambas as espécies a viabilidade celular é bastante prejudicada após 6 horas de exposição às concentrações de chumbo.

O teste de viabilidade celular com diferentes concentrações de chumbo foi utilizado para avaliar a toxicidade do metal e dessa forma escolher duas concentrações que seriam utilizadas na análise da interferência dessa toxicidade sobre o mecanismo de regulação de volume celular. Assim, foram escolhidas as concentrações de 10 e 40 $\mu$ M. Sabendo que a exposição das células branquiais ao chumbo durante a análise de regulação de volume celular duraria 20 minutos, a concentração de 10 $\mu$ M foi escolhida por não alterar a viabilidade das células de ambas as espécies durante 1 hora de exposição. Já a concentração de 40 $\mu$ M foi escolhida por ser mais tóxica a uma das espécies (*Hepatus pudibundus*) em 1 hora de exposição.

O processo de regulação de volume celular é um mecanismo fundamental para o bom funcionamento de toda e qualquer célula. Células branquiais que estão expostas a variações



do meio ambiente devem portanto regular volume para a manutenção de sua homeostase. A exposição de células branquiais de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus* a um choque hiposmótico correspondente a 75% da concentração osmótica da hemolinfa dos animais, demonstrou que as células de ambas as espécies são perfeitamente capazes de regular volume celular, isto é, durante a exposição ao choque hiposmótico, as células mantiveram seu volume inalterado. Entretanto, durante exposição a um choque de maior intensidade 50%, houve diferença na resposta das células branquiais das duas espécies. Enquanto células de *Hepatus pudibundus* conseguiram manter seu volume inalterado, células de *Callinectes ornatus* incharam cerca de 5%, e apesar de existir uma tendência de recuperação de volume celular, ao fim do experimento (20 min) as células apresentavam um inchaço ainda significativo de 3%.

Esses resultados indicam que num choque de menor intensidade, as células de ambas as espécies ativam mecanismos para conter a entrada de água na célula, mantendo assim o volume celular inalterado. No choque de maior intensidade, o inchaço que ocorre nas células de *Callinectes ornatus* (5%) é bem menor do que a intensidade do choque aplicado. Isso significa que as células ativam mecanismos de regulação de volume celular, no sentido de minimizar o inchaço celular (Souza e Scemes 2000; Amado *et al*, 2006; Ruiz e Souza, 2008; Cruz e Souza, 2008).

No capítulo I foi analisada *in vivo* a capacidade de hidratação do tecido branquial de animais submetidos a uma diminuição de salinidade (de 33 para 25‰) que corresponde a um choque hiposmótico de 75%. Naquela ocasião, ambas as espécies mantiveram o teor de hidratação das brânquias frente à mudança de salinidade, corroborando com os resultados *in vitro* de regulação de volume celular diante dessa intensidade de choque hiposmótico encontrados aqui.

A pequena alteração de volume encontrada nas células brânquias de *Callinectes ornatus* no choque hiposmótico de maior intensidade (50%) pode ser resultado dos mecanismos relacionados às diferentes estratégias de regulação osmótica e iônica que as duas espécies adotam, conforme discutido no capítulo I. Enquanto *Hepatus pudibundus* investe em IIR (regulação isosmótica intracelular), o que exige que ele seja um excelente regulador de volume, *Callinectes ornatus* investe em AER (regulação anisosmótica extracelular) tentando evitar variações osmóticas na hemolinfa que levem a alterações de volume celular. Suas células portanto não precisam exibir mecanismos de regulação de volume celular. Entretanto, células brânquias estão expostas tanto a alterações osmóticas da hemolinfa, como do meio externo. Dessa forma, diante de variações do meio externo, precisam regular volume, independente da estratégia de regulação osmótica e iônica adotada pelo animal, isso justifica as duas espécies terem conseguido regular volume no choque de menor intensidade e as diferenças entre elas aparecerem somente no choque de maior intensidade.

Em dois estudos anteriores do nosso laboratório, a capacidade de IIR versus a capacidade de AER foi testada em crustáceos com diferentes padrões de regulação osmótica e iônica e grau de eurialinidade. Nesses estudos *Hepatus pudibundus* também demonstrou melhor capacidade de regulação de volume celular (IIR) do que outras espécies osmorreguladoras que realizam AER (Freire *et al*, 2008b; Foster *et al*, 2010). Foster e colaboradores (2010) submeteram fatias de tecido muscular de *H. pudibundus* a um choque hiposmótico de 70% (30% de redução). Naquela situação, assim como as células branquiais, o tecido foi completamente capaz de manter sua hidratação. Quando o tecido muscular de *H. pudibundus* foi submetido a uma diluição mais intensa (50%) também foi capaz de regular volume, apesar de apresentar inchaço nos primeiros minutos de exposição conseguiu retornar ao nível de hidratação inicial (Freire *et al*, 2008b). No presente estudo, entretanto, diante de um choque hiposmótico de 50% as células branquiais nem chegaram a inchar. Essa diferença

pode ser devido ao fato da regulação de volume ser mais evidente em células isoladas, e que o inchaço identificado no tecido nos primeiros minutos pode ser resultado de acúmulo de água no espaço intersticial, resultado da RVD celular.

A exposição das células branquiais de ambas as espécies a duas concentrações de chumbo sob isosmoticidade levou a uma grande perda de volume celular. As células de ambas as espécies murcharam praticamente na mesma intensidade durante exposição à concentração de 40µM. A concentração de 10µM fez com que as células de *Hepatus pudibundus* reduzissem volume da mesma maneira que a concentração de 40µM. Entretanto, células de *Callinectes ornatus* tiveram uma menor redução de volume durante exposição à concentração de 10µM. Esses resultados, considerando que não foi aplicado choque osmótico, indicam que de alguma forma, o chumbo causou um desequilíbrio osmótico e/ou iônico fazendo com que as células perdessem água e reduzissem o volume.

A interação entre íons  $Pb^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  tem sido identificada em numerosos modelos celulares tanto *in vivo* como *in vitro* (Beeby 1978; Simons 1993; Rogers *et al*, 2003; Kempe *et al*, 2005; Li *et al*, 2008). Postula-se ainda que essa relação entre  $Pb^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  pode envolver mimetismo iônico (Bridges e Zalups, 2005). Dessa forma, um aumento na concentração de chumbo dentro das células pode mimetizar um aumento na concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular. Sabe-se que aumentos na concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular resultam, em inúmeros sistemas celulares, na ativação de mecanismos de redução regulatória de volume – RVD (McCarty e O’Neil, 1992; Hoffmann e Dunham, 1995; Wehner *et al* 2003). Assim, a redução de volume celular encontrada durante a exposição das células branquiais ao chumbo em condição isosmótica pode ser resultado da entrada de chumbo na célula e de mimetismo iônico entre  $Pb^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ , o que desencadearia ativação de mecanismos de RVD, ou seja, liberação de osmólitos orgânicos ou inorgânicos com conseqüente perda de água e redução do volume

celular. Diversos sistemas de transporte envolvidos na RVD foram reportados como cálcio-dependente, como por exemplo vias condutivas de  $K^+$  e  $Cl^-$  (Pasantes-Morales e Morales-Mulia, 2000; Wehner *et al*, 2003) e vias osmosensitivas de liberação de taurina (Cardin *et al*, 2003).

Redução de volume celular após exposição ao chumbo também foi encontrada em eritrócitos humanos. Os eritrócitos perderam volume em concentrações de nitrato de chumbo ainda mais baixas (0,3; 1; 3 $\mu$ M) do que as utilizadas aqui. Nesse estudo com eritrócitos Kempe e colaboradores (2005) também discutem a ativação de canais de  $K^+$ -dependentes de  $Ca^{2+}$  por chumbo. Utilizando um aumento da concentração de  $K^+$  extracelular e também de um inibidor de canais de  $K^+$  na solução ringer em que os eritrócitos foram expostos ao chumbo, a redução de volume celular pôde ser revertida. O aumento experimental da concentração de  $K^+$  extracelular dissipa os gradientes de  $K^+$  e impede que estes saiam da célula, mesmo que os canais estejam abertos. E clotrimazole, inibidor de canais de  $K^+$ -dependentes de  $Ca^{2+}$ , também impede a saída de  $K^+$  da célula. Assim os resultados sugerem que nos eritrócitos, a atuação de  $Pb^{2+}$  sobre os canais de  $K^+$ -dependentes de  $Ca^{2+}$  leva a saída de  $K^+$  da célula e conseqüente redução de volume celular.

Também, essa peculiar perda significativa de volume em condições isosmóticas pode ser resultado das células estarem entrando em processo de apoptose. Redução de volume apoptótica, ou AVD (*Apoptotic volume decrease*), é uma característica marcante do processo de morte celular programada e considerada como parte integral da via apoptótica (Bortner e Cidlowski, 1998; Alfieri e Petronini, 2007). A redução de volume durante o processo apoptótico está relacionada com o efluxo de  $Na^+$  e  $K^+$  através da  $Na^+K^+$ ATPase e de canais de  $K^+$ - $Ca^{2+}$  dependentes (McCarthy e Cotter 1997).

Metais pesados já foram relacionados com indução de apoptose em outros estudos. O cádmio foi indicado como potencial fator apoptótico em testículos do teleósteo marinho *Gobius niger* pela indução de expressão de caspase 3 (Migliarini *et al*, 2005). Cádmio e chumbo também induzem apoptose em eritrócitos de aves (Romero *et al*, 2009). O chumbo em concentrações próximas ao do presente estudo também induz apoptose em neurônios hipotalâmicos de camundongos (Loikkanen *et al*, 2003), além de estar relacionado à indução de apoptose no cérebro de ratos tratados *in vivo* com chumbo via peritoneal e via oral (Sharifi *et al*, 2002; Kumar *et al*, 2009).

Apesar dessas evidências de que metais estão relacionados com apoptose, nossos resultados de viabilidade celular não demonstraram muito comprometimento de viabilidade quando as células foram expostas a 10µM de nitrato de chumbo por 1 hora (3 vezes o tempo de análise de volume celular). Mas deve ser considerado que o método de exclusão pelo azul de tripan não é o melhor método para identificar células em processo de apoptose.

Outra forma de atuação do chumbo na redução de volume celular poderia ser a modulação de canais de água, ou aquaporinas (AQP), ainda sob o argumento de mimetismo com o  $\text{Ca}^{2+}$ . Sabe-se que algumas aquaporinas são reguladas pelo  $\text{Ca}^{2+}$ , como a AQP6, expressa em células intercalares do ducto coletor do rim, que possui um sítio de ligação para calmodulina (Rabaud *et al*, 2009). De fato, o chumbo induz aumento da permeabilidade da AQP4 em astrócitos, sendo que o efeito do chumbo foi atenuado na presença de um inibidor da proteína quinase II  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina-dependente (Gunnarson *et al*, 2005).

Resultados preliminares apresentados neste capítulo indicam que a utilização de cloreto de mercúrio (inibidor de aquaporinas) durante exposição das células branquiais ao chumbo reverte a perda de volume encontrada quando células de *Hepatus pudibundus* foram expostas somente ao chumbo. Embora isso não ocorra com células de *Callinectes ornatus*,

que parecem perder ainda mais volume durante a inibição de aquaporinas. Entretanto, a inibição de aquaporinas em condições isosmóticas sem a presença do chumbo resultou em alteração de volume celular apenas em *Hepatus pudibundus*, indicando que talvez essa espécie seja mais dependente de aquaporinas para a regulação de volume celular do que *Callinectes ornatus*. A hipótese de atuação do chumbo nas aquaporinas deve ser considerada embora mais estudos sejam necessários para tal afirmação.

Apesar de todas essas considerações, os mecanismos envolvidos na perda de volume induzida pelo chumbo sob condição isosmótica ainda não estão totalmente claros. Entretanto, a incapacidade das células executarem RVI após a perda de volume apresentada pode ser explicada através das consequências da interação do chumbo com os principais transportadores envolvidos na regulação de volume celular.

O processo de RVI envolve a tomada de osmólitos, principalmente condutância de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  através de transportadores como o co-transporte  $\text{Na}^+-2\text{Cl}^--\text{K}^+$ , e os trocadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ,  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ . Também, em células que expressam esses transportadores, a  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  é particularmente importante durante a RVI por estabelecer uma força dirigida para a tomada de íons  $\text{Na}^+$  (Wehner *et al*, 2003). O chumbo inorgânico divalente ( $\text{Pb}^{2+}$ ) possui forte atração por grupos sulfidril ( $\text{S}^-$ ) de proteínas, podendo causar inibição ao interagir e se ligar a esses grupos no sítio ativo de enzimas (Spokas *et al*, 2002).

De fato, diminuição da tomada de íons  $\text{Na}^+$  e inibição da atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  após exposição ao chumbo foi identificada em brânquias do crustáceo *Cherax destructor* (Ahern e Morris, 1998), e do peixe *Oncorhynchus mykiss* (Rogers *et al*, 2003). Além disso, postula-se também, que o  $\text{Pb}^{2+}$  possa ser transportado via trocadores aniônicos. Alguns estudos que utilizaram DIDS<sup>1</sup> (2,2-ácido dissulfídrico 4,4-diisotiocianatostilbeno, inibidor do trocador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ) identificaram diminuição na tomada de  $\text{Pb}^{2+}$  (Bridges e Zalups, 2005 e

referências nele). Assim, a interação do chumbo com as principais vias envolvidas na condutância de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  pode estar inibindo a recuperação de volume celular (RVI) nas células branquiais deste estudo.

Se em condições isosmóticas o chumbo parece ter o mesmo efeito (redução de volume) nas duas espécies, quando as células branquiais foram expostas ao chumbo associado ao choque hiposmóticos de 75% houve um padrão de resposta diferente entre as duas espécies. O chumbo associado à hiposmotividade não só fez com que células de *Callinectes ornatus* perdessem capacidade de regulação de volume celular apresentada anteriormente durante exposição aos choques hiposmóticos, como causou, curiosamente, uma maior redução de volume celular se comparado à quando as células foram expostas ao chumbo sob isosmotividade. Entretanto, as células de *Hepatus pudibundus* mantiveram capacidade de regulação de volume celular não apresentando redução de volume como a encontrada durante exposição ao chumbo sob isosmotividade, o que parece ter sido compensado pelo gradiente osmótico.

Essas diferentes alterações de volume celular ocasionada pela associação do chumbo à hiposmotividade podem ser explicadas através de um processo físico de especiação de metais e de um processo fisiológico referente à estratégia osmorregulatória empregada pelos animais.

Redução de salinidade necessariamente implica em redução da concentração de cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) no meio, com conseqüente redução da complexação de metais, como chumbo, zinco, cobre e cádmio, com o cloro (Rainbow, 1995; Wright 1995). Com menos possibilidade de complexação aumenta a biodisponibilidade do metal no meio. Como propõe o modelo do biótico ligante (BLM) quanto maior a concentração de íons metálicos livres, maior a ligação destes com a membrana celular e maior a tomada destes pela célula (Playle, 2004). Ou seja, quanto menor a osmolalidade maior a biodisponibilidade do metal. Assim, esse fenômeno

físico pode explicar as células brânquias de *Callinectes ornatus* perderem ainda mais volume, mesmo que diante de hiposmotividade. Uma maior quantidade de chumbo estaria entrando na célula e potencializando ainda mais a redução de volume. Além disso, com a diluição, também diminui a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  na salina. Menos  $\text{Ca}^{2+}$  implica em menor competição entre  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Pb}^{2+}$  no sítio de ligação com os transportadores de membrana facilitando ainda mais a entrada de chumbo (Grosell *et al*, 2006). De fato, a concentração de chumbo dissolvido medida nas soluções hiposmóticas foi maior do que o chumbo dissolvido na solução isosmótica, sendo que o aumento de chumbo dissolvido encontrado foi proporcional à intensidade de choque (ver tabela 1 página 83).

Também, a estratégia de regulação osmótica e iônica que *Callinectes ornatus* emprega pode estar interferindo ainda mais nesse processo de maior tomada de  $\text{Pb}^{2+}$ . Diante de uma salinidade reduzida, as células branquiais de um organismo osmorregulador, como é o caso de *Callinectes ornatus*, utilizam da ativação de sistemas de transporte de membrana para a tomada de sal para corrigir desvios da osmolalidade da hemolinfa. Assim, diante de um choque hiposmótico a presença desses transportadores na membrana das células branquiais pode permitir uma maior entrada de  $\text{Pb}^{2+}$  na célula. Esse mecanismo não está presente em células branquiais de animais osmoconformadores que não realizam tomadas de sal diante de diminuição de salinidade, como é o caso de *Hepatus pudibundus*. Dessa forma, nas células de *Hepatus pudibundus* o excesso de água devido ao choque hiposmótico estaria compensando a perda de volume causada pelo chumbo. Permitindo, portanto, que as células branquiais dessa espécie regulem volume sob hiposmotividade associada ao chumbo.

Capacidade de regulação de volume como essa de *Hepatus pudibundus* também foi encontrada em peixes, que são animais osmorreguladores. A exposição de células branquiais de truta a duas concentrações de cobre (10 e 100 $\mu\text{M}$ ) durante um choque hiposmótico não



resultou em nenhum efeito, as células incharam e executaram RVD da mesma forma que durante um choque hiposmótico na ausência do metal (Leguen e Prunet, 2001). Entretanto, Leguen e Prunet não avaliaram o efeito do cobre sobre a manutenção de volume celular em condição isosmótica, não ficando claro portanto, se o cobre teria capacidade de alterar o balanço hídrico celular como ocorrido com o chumbo no presente estudo.

Se os resultados discutidos até agora sugerem que as respostas diferentes das duas espécies à toxicidade do chumbo sobre a regulação de volume celular se referem a diferentes mecanismos de regulação osmótica e iônica empregados, as diferenças entre as espécies ficam ainda mais evidentes quando bloqueadores de vias iônicas foram utilizados. O verapamil, inibidor de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  foi empregado pela importante relação que existe entre  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , e pelos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  serem possivelmente a via de entrada de chumbo na célula. A ouabaína, inibidor da  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ , foi utilizada pela NaK ser uma importante enzima na manutenção da homeostase celular e possível alvo de toxicidade do chumbo. Por fim, a inibição de canais de água por  $\text{HgCl}_2$  foi empregada devido a grande perda de água pelas células durante exposição ao chumbo, que talvez pudesse ocorrer via aquaporinas. Assim a inibição dessas importantes vias pode ajudar a elucidar o mecanismo de entrada e de toxicidade do chumbo.

Células branquiais de *Callinectes ornatus* incharam com a inibição de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e da  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  indicando que esses transportadores são importantes para a manutenção do volume celular em condições isosmóticas. O mesmo não aconteceu com *Hepatus pudibundus*, que segundo resultados preliminares parece ser mais dependente de aquaporinas para a manutenção de volume sob isosmotividade. Aumento de volume celular em condições isosmóticas após inibição da  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  por ouabaína já foi descrito em outros tipos celulares (Lang *et al*, 1998; Wehner *et al*, 2003). A atividade dessa enzima tem um importante papel na manutenção do volume celular e sua inibição leva a um maior acúmulo de  $\text{Na}^+$

dentro da célula, pela dissipação dos gradientes de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . Além disso, íons  $\text{Cl}^-$  entram na célula para a manutenção do balanço eletrogênico. Acúmulo de  $\text{NaCl}$  dentro da célula, devido à inibição da  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ , resulta em entrada de água e aumento de volume celular (Lang *et al*, 1998). Já a inibição de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula pode comprometer o vazamento de potássio através de canais de  $\text{K}^+$   $\text{Ca}^{2+}$ -dependentes (Wehner *et al*, 2003), resultando em acúmulo de  $\text{K}^+$  dentro da célula com conseqüente aumento do volume celular.

A inibição de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  por verapamil na presença de chumbo também evidenciou respostas diferentes entre as espécies. Em *Hepatus pudibundus* a inibição de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  reverteu a perda de volume ocasionada pelo chumbo quando esses canais não estavam inibidos. Esse resultado apóia a hipótese discutida acima que o  $\text{Pb}^{2+}$  poderia entrar na célula através de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e mimetizar uma sinalização para a RVD (efluxo de  $\text{K}^+$ ) o que levaria a diminuição de volume celular, ou ainda ativando aquaporinas e liberando água. Em condição hiposmótica, as células mantiveram a capacidade de regulação de volume apresentada anteriormente quando expostas a contaminação por chumbo sob hiposmoticidade na ausência do bloqueador. Ou seja, mesmo sem o inibidor, a contaminação por chumbo durante um choque hiposmótico já não tinha sido problema para as células de *Hepatus pudibundus* que, talvez devido ao gradiente osmótico, conseguiram regular volume celular. Dessa forma, mesmo sem diferença entre as respostas das células durante a inibição e a não inibição, ainda assim esse resultado pode auxiliar na sugestão de íons  $\text{Pb}^{2+}$  entrarem na célula via canais de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Entretanto, *Callinectes ornatus* apresentou, embora mais rápida, a mesma redução de volume encontrada quando os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  não estavam inibidos por verapamil. Esse resultado, embora inesperado, sugere que talvez canais de  $\text{Ca}^{2+}$  não estejam envolvidos na tomada do metal, pelo menos em condições isosmóticas. Já a inibição por verapamil durante contaminação por chumbo em condição hiposmótica resultou em menor perda de volume

quando comparado à contaminação por chumbo sob isosmotividade. Na verdade as células praticamente conseguiram regular volume celular ao fim do tempo experimental. Se lembrarmos que a inibição de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  por verapamil na condição controle levou a aumento de volume de cerca de 10%, a inibição desses canais na presença de chumbo estaria apenas compensando a perda de volume causada pelo chumbo.

Se em células de *Hepatus pudibundus* os efeitos do chumbo parecem estar ligados à entrada de  $\text{Pb}^{2+}$  via canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , os resultados da inibição da  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  por ouabaína indicam que talvez esta importante enzima não seja alvo da toxicidade do chumbo em células branquiais dessa espécie. Durante a contaminação por chumbo em condição isosmótica, a inibição da NaK, não surtiu efeito, as células continuaram murchando da mesma maneira. Entretanto durante a contaminação por chumbo sob hiposmotividade, as células perderam a capacidade de regulação de volume apresentada anteriormente e murcharam na mesma intensidade da contaminação por chumbo sob isosmotividade. Se a inibição da NaK não teve efeito em condição controle isosmótica nem durante contaminação por chumbo sob isosmotividade, mas teve efeito (não de reverter, mas de aumentar a variação de volume) durante associação do chumbo ao choque hiposmótico, é possível concluir que, ao invés de alvo de toxicidade de chumbo essa enzima seja importante na recuperação de volume celular (RVI) em células branquiais de *Hepatus pudibundus*.

Como mencionado anteriormente, a importância da NaK na RVI é estabelecer uma força dirigida para a tomada de íons  $\text{Na}^+$  (Wehner *et al*, 2003). Assim, a inibição dessa enzima cessa essa atividade, a tomada de íons  $\text{Na}^+$  fica comprometida e a recuperação de volume prejudicada. Também, uma outra possibilidade é que a inibição da NaK faça com que o  $\text{Na}^+$  encontre outra via para sair da célula. A inibição da NaK por ouabaína em cardiomiócitos de embrião de galinha, fez com que o  $\text{Na}^+$  que normalmente sairia por meio dessa proteína utilizasse uma outra via para a saída, o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Isso aumenta os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$

dentro da célula, que funciona como um sinalizador do processo regulatório, otimizando assim a RVD (Smith *et al*, 1992; Souza *et al*, 2000). Assim, uma RVD otimizada somada a atuação do chumbo e somada ao prejuízo de realizar RVI pode levar a uma maior perda de volume celular com a inibição da NaK durante contaminação por chumbo sob isosmoticidade.

Em *Callinectes ornatus*, os resultados de inibição da NaK também sugerem que essa enzima talvez não seja alvo da toxicidade do chumbo. A inibição da NaK na presença do chumbo, tanto em isosmoticidade, como em hiposmoticidade inibiu a perda de volume encontrada nessas condições sem a ouabaína. As células murcharam menos e praticamente conseguiram regular volume celular ao fim do tempo experimental. Como a NaK exerce papel fundamental na manutenção de volume celular, uma vez que as células incharam após sua inibição em condição controle, a inibição da NaK na presença do chumbo estaria compensando o efeito do chumbo na redução de volume celular.

A análise de volume celular na presença de bloqueadores sugere que canais de  $\text{Ca}^{2+}$  são candidatos para a entrada de chumbo nas células de *Hepatus pudibundus* em condições isosmóticas e em células de *Callinectes ornatus* em condições hiposmóticas. E que a  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  parece não ser alvo da toxicidade do metal em nenhuma das espécies. Apesar de preliminares, os resultados também sugerem que aquaporinas podem ser alvo de atuação do metal, pelo menos em uma das espécies. Também, a toxicidade do chumbo no tecido branquial é diferente dependendo da estratégia osmótica exibida pelos animais e dependendo do grau de capacidade de regulação de volume celular. Diante de diminuição de salinidade as células branquiais da espécie osmorreguladora ficam mais comprometidas do que as células da espécie osmoconformadora.

**Efeito do chumbo sobre a expressão do fenótipo MXR em brânquias de caranguejos**

### **Capítulo III**

## RESUMO

O interesse por mecanismos de defesa em organismos sob condições de contaminação é crescente, uma vez que vários organismos são capazes de viver em ambientes com altos níveis de xenobióticos. Essa tolerância pode ser pelo menos em parte resultado da expressão do fenótipo de resistência a multixenobióticos (MXR), mecanismo que têm sido descrito em diferentes animais aquáticos. A resistência é atribuída a uma proteína transmembrana de 170 kDa, a glicoproteína P (P-gp), que previne as células de acumularem substratos. O objetivo desse capítulo foi identificar a expressão do fenótipo MXR assim como avaliar a influência de do chumbo sobre o mecanismo MXR. Para tanto, depois de crioanestesiados exemplares de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus* tiveram suas brânquias removidas, divididas em pequenos fragmentos que foram submetidos ao teste de acúmulo de rodamina na presença ou ausência de verapamil. Posteriormente, o mesmo teste foi conduzido com 4 concentrações de chumbo (1, 10, 20 e 40 $\mu$ M). Houve aumento no acúmulo de rodamina (substrato do P-gp) na presença de verapamil em ambas as espécies. *Hepatus pudibundus* acumulou 84% e *Callinectes ornatus* 68% mais rodamina no tecido branquial. Esses resultados são indicativos da presença da P-gp no tecido branquial e portanto da expressão do fenótipo MXR. Quando o tecido branquial foi exposto a concentrações de chumbo houve diminuição do acúmulo de rodamina nas concentrações mais baixas de nitrato de chumbo (1 e 10 $\mu$ M em *Callinectes ornatus* e 10 $\mu$ M em *Hepatus pudibundus*). Esses resultados indicam indução do mecanismo MXR por chumbo, através do aumento da atividade da P-gp.

## 1 INTRODUÇÃO

O interesse por mecanismos de defesa em organismos sob condições de contaminação é crescente, uma vez que vários organismos são capazes de viver em ambientes com altos níveis de xenobióticos. A resistência simultânea de vários organismos aquáticos à presença de diferentes químicos em águas poluídas pode ser explicada, pelo menos parcialmente, porque organismos aquáticos são equipados constitutivamente com um mecanismo que previne as células de sofrerem dano bombeando xenobióticos tóxicos para fora da célula antes deles expressarem seu potencial deletério (Kurelec *et al*, 2000). Esses animais expressam o fenótipo de resistência a multixenobióticos (MXR), mecanismo que têm sido descrito em diferentes animais aquáticos (Bard, 2000; Smital *et al*, 2000; Hamdoun *et al*, 2002; Shúilleabháin *et al*, 2005; Žaja *et al*, 2006; Moreau *et al*, 2008; Zhou *et al*, 2009).

A resistência a multixenobióticos (MXR) é semelhante à resistência a múltiplas drogas (MDR) observada em linhagens de células tumorais resistentes a quimioterápicos (Bard, 2000). Em ambos os casos a resistência é atribuída a uma proteína trans-membrana de 170 kDa, a glicoproteína P (P-gp), que previne as células de acumularem substratos. A P-gp é uma ATPase altamente inespecífica que atua para translocar uma variedade enorme de substratos, que diferem estruturalmente e funcionalmente, de modo a prevenir o acúmulo celular de metabólitos endógenos e xenobióticos, causando portanto resistência a esses substratos (Kurelec, 1995; Bard 2000).

A P-gp pertence à superfamília ABC (*ATP binding cassette*) de transportadores de membrana, uma das maiores classes de proteína conhecidas que conta com numerosas proteínas envolvidas no tráfego de moléculas através da membrana celular. Para a maioria dos transportadores ABC a ligação e subsequente hidrólise de ATP em seu domínio de ligação de

nucleotídeo (NBDs) são necessárias para fornecer energia para o transporte de seus substratos pela membrana. Além da P-gp, outras proteínas ABC também são capazes de prevenir o acúmulo de drogas, como a MRP uma proteína de 190kDa, ou ainda a BCRP originalmente isolada de uma linhagem celular de câncer de mama resistente a multidrogas (Leslie *et al*, 2005).

Apesar de relacionadas essas proteínas diferem estruturalmente. A P-gp é um dímero de 1280 aminoácidos, sendo que cada metade da proteína consiste de seis regiões trans-membrana, um domínio citoplasmático e um sítio de ligação ao ATP (Bard, 2000). A MRP contém 1531 aminoácidos com apenas 15% de homologia com a P-gp, e além dos 12 segmentos trans-membrana possui cinco segmentos adicionais ligados à região N-terminal (Litman *et al*, 2001). A BCRP consiste de uma única metade contendo seis segmentos trans-membrana (Leslie *et al*, 2005). Apesar dessas diferenças na organização dos domínios existe uma considerável sobreposição de drogas as quais os três tipos de proteínas conferem resistência.

Em mamíferos, 2 classes de P-gp (codificadas por genes MDR) já foram bem caracterizadas. A classe I refere-se a transportadores de drogas, enquanto a classe II transporta fosfatidilcolina. Além desses dois tipos de P-gp, existe também uma P-gp-irmã, ou spgp, de 160kDa que transporta sais biliares no fígado. O anticorpo monoclonal C219 reconhece uma sequência interna e altamente conservada de aminoácidos próxima ao domínio de ligação do nucleotídeo comum a todas as isoformas da P-gp cuja sequência é conhecida. Estudos com animais aquáticos utilizando o C219 têm identificado P-gps em vários tipos celulares, além da homologia funcional de resistência a multixenobióticos. Mas essa informação é insuficiente para classificar definitivamente essas P-gps segundo a nomenclatura utilizada em mamíferos (Bard 2000).



A ampla distribuição filogenética de genes da P-gp sugere que proteínas resistentes a multixenobióticos devem ser comuns a todos os organismos e devem transportar substratos endógenos, além de drogas e poluentes. Existem vários métodos de se estudar a atividade ou indução da P-gp, os mais comuns são ensaios utilizando rodamina B, um fluorescente que é substrato da P-gp. Os ensaios podem ser tanto *in vivo* como *in vitro*, e são uma forma indireta de medir a atividade de transporte da P-gp através da leitura da intensidade de fluorescência emitida pela rodamina. Existem dois métodos, o ensaio de acúmulo de rodamina e o ensaio de efluxo de rodamina.

O ensaio de acúmulo de rodamina aparentemente é o mais utilizado. Esse método consiste de incubar células, tecido ou mesmo um organismo em uma determinada concentração de rodamina B por um determinado período de tempo e então medir a intensidade de fluorescência contida nas células, tecido ou organismo. Quanto menor for a fluorescência emitida, maior a expressão MXR devido à P-gp estar ativa, transportando o fluorescente para fora da célula e prevenindo assim seu acúmulo. Uma forma de confirmar a atividade da P-gp é adicionar durante a incubação com rodamina, um bloqueador do transportador, ou um competidor de substrato, como o verapamil por exemplo. Dessa forma, com a P-gp inibida haverá um maior acúmulo de rodamina e consequentemente maior emissão de fluorescência (Kurelec *et al*, 2000). O princípio do ensaio de efluxo de rodamina é o inverso do acúmulo. Nesse caso, mede-se a taxa de efluxo do fluorescente e normalmente é empregado na confirmação de resultados obtidos no ensaio de acúmulo de rodamina, a realização desse ensaio irá assegurar que o maior acúmulo de rodamina é de fato fruto da inibição do efluxo (Kurelec *et al*, 2000).

Boa parte do conhecimento que existe sobre a indução do mecanismo MXR em animais aquáticos são estudos com moluscos (Eufemia e Epel, 2000; Minier *et al*, 2000; Smital *et al*, 2000; Kepler e Ringwood, 2001a,b; Achard *et al*, 2004; Kington *et al*, 2007;

Sandrine e Marc, 2007; Ivanina e Sokolova, 2008). Entretanto, a indução da atividade da P-gp para extrusão de xenobióticos por células de crustáceos sob ação de contaminantes ainda é pouco estudada. Recentemente, Timofeyev e colaboradores (2007) evidenciaram a presença de MXR em anfípodos pelo método da extrusão do fluorescente rodamina, enquanto Minier e colaboradores (2008) encontraram expressão da P-gp na glândula digestiva, mas não em brânquias do caranguejo aranha *Hyas araneus*.

Também, a indução do mecanismo MXR por metais ainda é pouco estudada. Mas sabe-se que metais como cádmio e zinco induzem a expressão da P-gp nas brânquias do molusco *Corbicula fluminea* (Achard *et al*, 2004). Ou ainda que a exposição ao cádmio aumenta a atividade e a expressão da P-gp em brânquias e hepatopâncreas da ostra *Crassostrea virginica* (Ivanina e Sokolova, 2008).

Existe portanto, uma lacuna no conhecimento da expressão do fenótipo MXR em crustáceos, principalmente em células branquiais e também do conhecimento da interação de metais como o chumbo com esse mecanismo.

## **2 OBJETIVOS**

### **Geral**

Analisar a expressão do fenótipo MXR no tecido branquial de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus*, assim como os efeitos da exposição ao chumbo sob esse mecanismo.

### **Específicos**

- Avaliar a expressão do fenótipo MXR utilizando o ensaio de acúmulo de rodamina na presença e ausência de verapamil, inibidor da P-gp, em ambas as espécies
- Analisar a influência de 4 concentrações de chumbo na expressão do fenótipo MXR no tecido braquial de ambas as espécies

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Coleta e Manutenção dos animais**

Os animais utilizados para os experimentos desse capítulo foram coletados e mantidos em condições descritas no capítulo I. Ver item 3.1 da página 38.

#### **3.2 Preparo das soluções experimentais**

Para os experimentos, foram preparadas a solução controle (correspondente à hemolinfa dos animais) e soluções experimentais de diferentes concentrações de chumbo, conforme descrito no capítulo II. Ver item 3.2 da página 74.

#### **3.3 Identificação do fenótipo MXR**

Para a identificação do fenótipo MXR no tecido branquial dos crustáceos, exemplares das duas espécies foram crioanestesiados e tiveram sua carapaça removida. As brânquias foram retiradas e repousaram em PBS. Depois de repousarem em PBS as brânquias foram divididas com o auxílio de um estilete em pequenos fragmentos de aproximadamente 5 mg.

Seguiu-se então o ensaio de acúmulo do fluorescente rodamina B (R6626 – Sigma, EUA) substrato da glicoproteína P (P-gp). O princípio desse método consiste da rodamina ser constantemente retirada da célula pela atividade da P-gp, se a célula possuir uma baixa expressão de P-gp (ou se ela estiver inativa) ocorrerá uma concentração, ou acúmulo do fluorescente dentro da célula. Quanto maior o acúmulo de rodamina dentro da célula, menor a expressão ou atividade da P-gp, e vice e versa.

Dessa forma, os fragmentos de tecido branquial foram expostos, em um tubo *eppendorf* de 2 ml, por 1 hora a 1µM do fluorescente rodamina (em solução salina) na

ausência (controle) e na presença de 25  $\mu\text{M}$  de verapamil (conhecido bloqueador de canais de cálcio e também inibidor da P-gp nessa concentração). Controles da fluorescência basal (autofluorescência) foram obtidos através da incubação de fragmentos do tecido branquial em solução salina controle na ausência de rodamina e também de verapamil.

Após a exposição, os fragmentos foram rapidamente lavados em solução salina e acondicionados individualmente em cada poço (contendo 200 $\mu\text{l}$  de solução salina) de uma microplaca de 96 poços específica para fluorescência (*Optiplat 96-well, Black*). Imediatamente após foi realizada a leitura da fluorescência correspondente ao acúmulo de rodamina. Essa leitura foi realizada em um leitor de microplacas (Tecan Infinite M200, Áustria) com 544nm de excitação e 590nm de emissão. Os fragmentos foram então pesados em balança de precisão (Bioprecisa FA2104N, Brasil), e a fluorescência foi expressa em função do peso úmido de cada fragmento em miligramas.

### **3.4 Efeito do chumbo sobre o fenótipo MXR**

Para avaliar se o chumbo exercia influência sobre a expressão do fenótipo MXR, pequenos fragmentos do tecido branquial foram expostos por 3 horas às seguintes condições: controle, 1 $\mu\text{M}$ , 10 $\mu\text{M}$ , 20 $\mu\text{M}$  e 40 $\mu\text{M}$  de nitrato de chumbo. Após a exposição, os fragmentos foram rapidamente lavados em solução salina e então, seguiu-se com o teste de acúmulo de rodamina, como descrito acima, porém sem a presença de verapamil.

### 3.5 Análise Estatística

Para todos os resultados foi calculada a média  $\pm$  desvio padrão da média. Para o tratamento estatístico foi utilizado o *teste t*. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ , e o tratamento estatístico executado pelo software Sigma Plot<sup>®</sup>.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Identificação do fenótipo MXR

A exposição de fragmentos branquiais de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus* ao teste de acúmulo do fluorescente rodamina na presença e ausência de verapamil 25 $\mu$ M resultou num maior acúmulo de rodamina quando o verapamil estava presente.

Em *Hepatus pudibundus* o valor de fluorescência referente ao acúmulo de rodamina praticamente dobrou quando o tecido branquial foi exposto à rodamina na presença de verapamil, aumento de 84%. Na situação controle, sem verapamil, o valor de fluorescência encontrado foi de  $2730,9 \pm 299,1$  unidade de fluorescência/mg de tecido enquanto que na presença de verapamil a fluorescência medida foi de  $5024,2 \pm 412,4$  u.f./mg tecido ( $p < 0,05$ ,  $n = 5$ ) (Figura 1A).

Em *Callinectes ornatus* a diferença entre a condição controle e a exposição ao verapamil foi um pouco menor, mas ainda assim significativa. Houve um aumento de 68% no acúmulo de rodamina. A fluorescência emitida pelo tecido branquial em condição controle foi de  $2293,5 \pm 377,9$  u.f./mg de tecido enquanto que na presença de verapamil a fluorescência encontrada foi de  $3852,3 \pm 311,3$  u.f./mg de tecido ( $p < 0,05$ ,  $n = 5$ ) (Figura 1B).

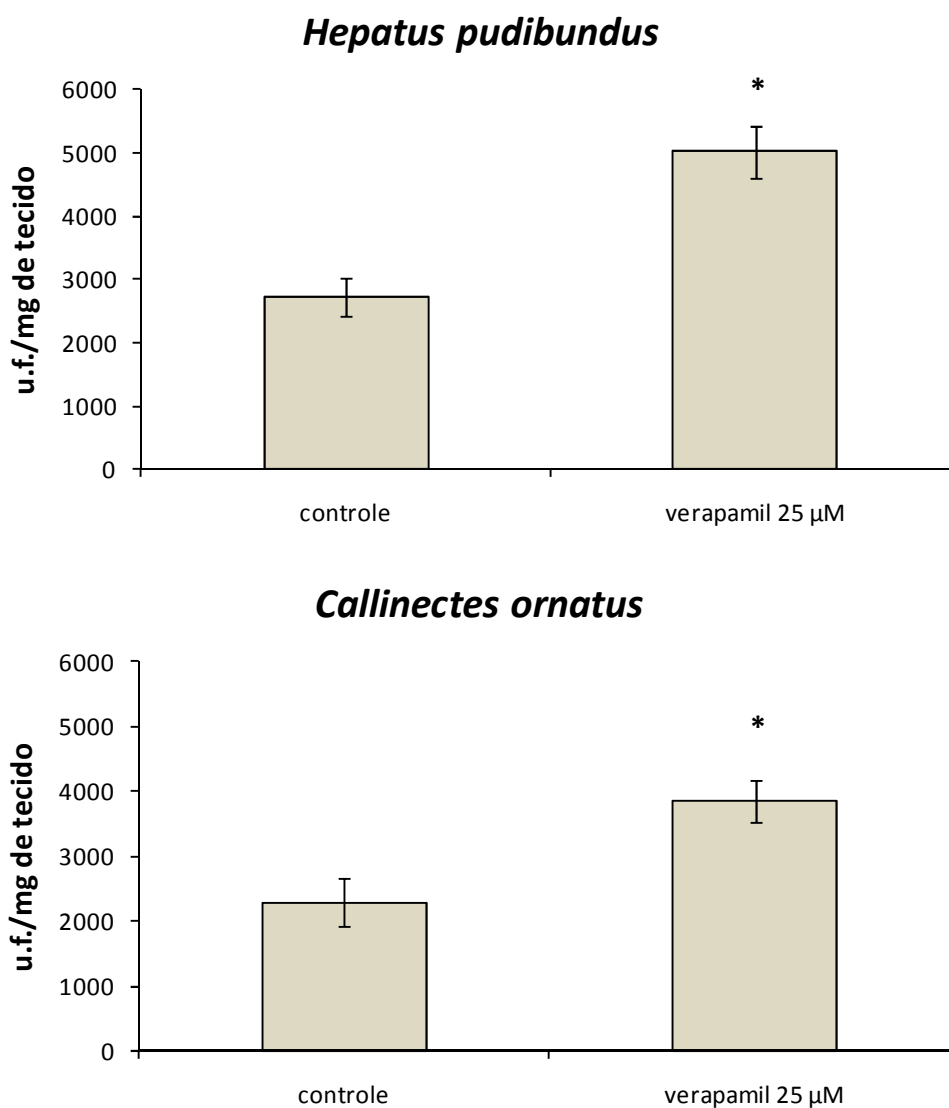


Figura 34: Identificação do fenótipo MXR no tecido branquial de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus* através de inibição por verapamil (25µM). As barras significam a fluorescência medida no tecido branquial. Quanto menor a fluorescência, maior a atividade do mecanismo MXR. (\*) indicam diferença estatística em relação ao controle (teste t,  $p < 0,05$ ,  $n = 5$ ).

#### 4.2 Efeito do chumbo sobre o fenótipo MXR

A exposição das brânquias de *Hepatus pudibundus* às diferentes concentrações de chumbo resultou em um menor acúmulo de rodamina nas concentrações de 1 e 10 µM. Na condição controle (sem chumbo) foi encontrado o valor de  $3853,6 \pm 283$  u.f./mg de tecido referente ao acúmulo de rodamina pelas células branquiais. Na concentração de 1 µM a



fluorescência medida foi  $2429,3 \pm 156,5$  u.f./mg de tecido, uma redução de 37% no acúmulo de rodamina ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ). De forma semelhante, a redução de acúmulo de rodamina encontrada após exposição das brânquias à concentração de  $40\mu\text{M}$  foi de 31% ( $2664,2 \pm 280$  u.f./mg de tecido) ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ). Não houve diferença no valor de fluorescência medido entre as concentrações de 20 e  $40\mu\text{M}$  e a condição controle (Figura 2A).

As brânquias de *Callinectes ornatus* entretanto, apresentaram diminuição no acúmulo de rodamina somente na concentração de  $10\mu\text{M}$ . O valor de fluorescência medido na condição controle foi de  $3828,8 \pm 305,9$  u.f./mg de tecido, enquanto na concentração de  $10\mu\text{M}$  foi de  $2541,6 \pm 253,8$ , uma redução de 37% ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ). Não houve diferença nos valores de fluorescência medidos entre as concentrações 1, 20 e  $40\mu\text{M}$  e a condição controle.

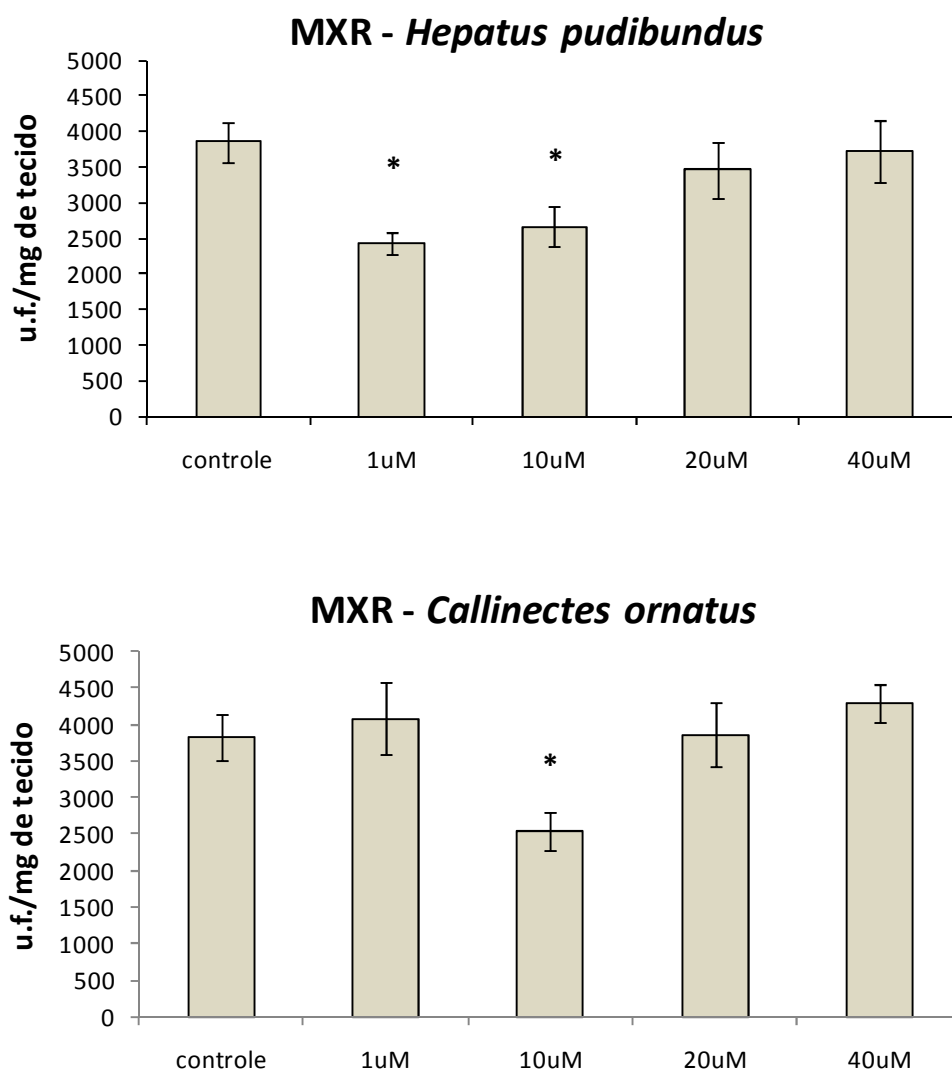


Figura 35: Mecanismo MXR no tecido branquial de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus* induzido após exposição a quatro concentrações de nitrato de chumbo. As barras significam a fluorescência medida no tecido branquial. Quanto menor a fluorescência, maior a atividade do mecanismo. (\*) indicam diferença estatística em relação ao controle (teste *t*,  $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ).

## 5 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os resultados da análise de acúmulo do fluorescente rodamina B no tecido branquial de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus* sugerem a expressão do fenótipo MXR nas brânquias desses crustáceos decápodos. O aumento do acúmulo, ou inibição do efluxo de rodamina por verapamil, um conhecido inibidor da P-gp, têm sido utilizada na identificação do fenótipo MXR em diversos estudos (Smital *et al*, 2000; Eufemia e Epel, 2000; Hamdoun *et al*, 2002; Pessatti *et al*, 2002; Smital e Sauerborn, 2002; Shúilleabháin *et al*, 2005).

No presente trabalho, a inibição de um possível homólogo da P-gp por verapamil sem exposição a nenhum poluente resultou num aumento de 84 e 68% no acúmulo de rodamina nas brânquias de *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus*, respectivamente. Esses resultados são parecidos com os encontrados em outros animais aquático, também sem a presença de poluentes. Como em peixes, onde o acúmulo de rodamina durante inibição por verapamil no fígado da carpa *Cyprinus carpio* foi de 70% (Smital e Sauerborn, 2002), e moluscos, já que brânquias do bivalve *Dreissena polymorpha* acumulam 80% mais rodamina na presença de verapamil (Smital *et al*, 2000). Também, existem casos onde o acúmulo é ainda maior, como 100% em células epidermais da truta *Oncorhynchus mykiss* (Shúilleabháin *et al*, 2005) e 150% em brânquias do mexilhão *Mytillus galloprovincialis* (Smital *et al*, 2000).

Smital e colaboradores (2000) em estudo de acúmulo e efluxo de rodamina na presença de inibidores como verapamil e ciclosporina sem nenhum tipo de poluente demonstraram que existem diferenças inerentes na atividade da P-gp em várias espécies de moluscos, e que essas diferenças podem ser, pelo menos em parte, responsáveis tanto pela resistência de umas espécies, como pela sensibilidade de outras à poluição. Pode-se assim especular que os resultados da inibição do mecanismo MXR por verapamil aqui apresentados sugerem que ambas as espécies possuem potencial para responder à contaminação utilizando

essa maquinaria de defesa. E que existe uma diferença basal de atividade do mecanismo MXR entre *Hepatus pudibundus* e *Callinectes ornatus*, o que pode significar diferença de resistência à contaminação entre as duas espécies. Entretanto, um estudo mais minucioso utilizando também o ensaio de efluxo de rodamina, assim como imunomarcagem da P-gp e análises de expressão gênica seriam necessários para confirmar essa hipótese.

Uma importante característica do mecanismo envolvido na expressão do fenótipo MXR é a possibilidade de ser induzido. Inúmeros estudos demonstram que a indução da P-gp ocorre em resposta a uma variedade de poluentes (Eufemia e Epel, 2000; Hamdoun *et al*, 2002; Shúilleabháin *et al*, 2005; Kington *et al*, 2007). Entretanto, a indução do mecanismo MXR por metais ainda é pouco estudada e muito ainda se discute se metais divalentes são ou não substrato da P-gp (Gottesman e Pastan, 1993; Eufemia e Epel, 2000).

Uma vez que um aumento da atividade da P-gp pode resultar em diminuição do acúmulo intracelular de substratos como rodamina, nossos resultados sugerem indução da atividade do mecanismo MXR em ambas as espécies em concentrações baixas de chumbo. Houve diminuição do acúmulo de rodamina na concentração de 1 e 10µM de nitrato de chumbo e não houve diferença no acúmulo de rodamina em concentrações como 20 e 40µM. Pessatti e colaboradores (2002) também encontraram indução do mecanismo MXR por chumbo em brânquias do molusco *Perna perna* após exposição a 1,2µM de nitrato de chumbo. Cabe ressaltar que *Hepatus pudibundus*, que parece ter maior expressão de transportadores ABC em condições controle do que *Callinectes ornatus*, foi a espécie que apresentou indução do fenótipo MXR nas concentrações de 1 e 10µM, enquanto *Callinectes ornatus* induziu o fenótipo apenas em 10µM, sugerindo que a maior expressão dos transportadores permite maior sensibilidade na resposta com a indução.

Indução do mecanismo MXR por metais também foi encontrada em brânquias do bivalve *Corbicula fluminea*. Achard e colaboradores (2004) verificaram um aumento no nível de expressão da P-gp tanto em campo, durante exposição dos animais a locais contaminados com cádmio e zinco, como em laboratório. Em laboratório, encontraram aumento da expressão da P-gp em 3 concentrações de cádmio testadas (15, 30 e 60µg/L), sendo que os maiores níveis de expressão da P-gp foram encontradas na concentração mais baixa 15µg/L. Os autores discutem que essa relação entre concentrações mais baixas induzirem maior expressão da P-gp pode ser resultado de uma baixa resistência dos bivalves e um baixo metabolismo de síntese de proteína conforme o nível de acúmulo do metal se aproxima de uma concentração letal, e que de fato 3 animais morreram durante exposição à concentração mais alta de 60µg/L.

Essa também poderia ser uma explicação para os nossos resultados. As concentrações mais altas de chumbo não induziram o mecanismo, mas também não o inibiram, uma vez que a emissão de fluorescência referente ao acúmulo de rodamina foi igual ao do controle. Assim, um baixo metabolismo devido à maior toxicidade do metal nas concentrações mais altas pode ser a causa desse resultado. De fato, os testes de viabilidade celular apresentados no capítulo II suportam essa idéia. Células de ambas as espécies tem a viabilidade prejudicada após 3 horas de exposição às concentrações mais altas chumbo.

Entretanto, outros estudos relatam concentrações mais altas de cádmio ativando o mecanismo MXR, e existe um relato de concentrações mais baixas inibindo o mecanismo. Concentração tão alta como 500µg/L de cloreto de cádmio diminui o acúmulo de rodamina e aumenta a expressão da P-gp em brânquias do bivalve *Mytilus californianus* (Eufemia e Epel, 2000). Também, a exposição de ostras *Crassostrea virginica* a 50µg/L de cloreto de cádmio resultou em indução da atividade do mecanismo MXR, além de aumento da expressão da P-

gp nas brânquias desses animais (Ivanina e Sokolova, 2008). Porém, concentrações baixas como 0,22 e 2,2 $\mu$ M de cloreto de cádmio causaram uma forte inibição do efluxo de rodamina em anfípodas de água doce (Timofeyev *et al*, 2007).

No presente estudo, apesar da exposição ao chumbo ter sido de curta duração (3 horas), e que talvez esse tempo não fosse suficiente para detectar aumento de expressão da proteína, ainda assim é plausível se considerar que esse aumento de atividade reflete aumento da concentração de P-gps. Ivanina e Sokolova (2008) encontraram aumento da atividade e da expressão da P-gp após exposição crônica de ostras ao cádmio. Apesar de ser uma exposição crônica (40 dias) não foi detectado aumento na quantidade de RNAm, sugerindo que o aumento na expressão da P-gp possa ser fruto de modificações pós-translacionais. Sabe-se que P-gps sofrem consideráveis modificações pós-translacionais incluindo fosforilação e glicosilação (Bard 2000). Assim, de alguma forma, sob influência do chumbo, é possível que o aumento da atividade da P-gp no tecido branquial após exposição ao metal por 3 horas seja reflexo do aumento da expressão de proteínas, via modificações pós-translacionais.

Nas situações em que há indução do mecanismo por metais é tentador assumir que o aumento da atividade e da expressão da P-gp está ligado a uma resposta para limitar o acúmulo de metal nas células expostas. Entretanto, ao identificarem que aumentos na expressão da P-gp (gene *mdr1* do mecanismo MDR, similar ao MXR) protegem células do túbulo proximal de rins de rato de apoptose induzida por cádmio, Thévenod e colaboradores (2000) especulam que essa proteção pode ser causada pelo transporte de ceramidas pela P-gp. Ceramidas são produtos da hidrólise de esfingomielina em resposta ao estresse celular, e conhecidas por ativar o fator NF-kB que inicia a apoptose. Assim, a P-gp estaria relacionada com a proteção de apoptose nessas células por transportar outro substrato (ceramida) e não por translocar cádmio para fora da célula.

A indução do mecanismo MXR por metais pode não necessariamente implicar em diminuição do acúmulo intracelular de íons metálicos. É evidente que a expressão da P-gp é um importante constituinte do arsenal de defesa celular, entretanto, a interação de metais com o mecanismo MXR ainda deve ser analisada com cautela e muitos outros estudos são necessários para elucidar essa questão.

## Conclusões e Perspectivas

Este trabalho teve o propósito de realizar um estudo comparativo a fim de investigar se os efeitos tóxicos do chumbo seriam diferentes entre animais osmoconformadores e osmorreguladores. Nossos resultados, além de corroborar dados recentes na literatura sobre a maior habilidade que osmoconformadores possuem de regular volume celular quando comparados com osmorreguladores, levanta uma nova questão: de que a menor capacidade de regulação de volume celular de animais osmorreguladores os torna mais suscetíveis à contaminação por chumbo e possivelmente por outros metais. O animal osmoconformador *Hepatus pudibundus* em outros trabalhos já havia se mostrado um excelente regulador de volume celular diante de diluição, e essa capacidade de regulação de volume diante de hiposmoticidade parece proteger suas células da redução de volume celular causada por Pb, o que não aconteceu com o animal osmorregulador.

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho é possível concluir que os efeitos tóxicos do chumbo podem ser diferentes conforme a estratégia osmótica e iônica adotada por animais aquáticos. Nossos resultados sugerem que células de animais osmorreguladores são mais suscetíveis à contaminação por metal do que células de animais osmoconformadores, principalmente em situações de redução de salinidade. Essa diferença na toxicidade do metal sobre células branquiais de osmoconformadores e osmorreguladores se torna especialmente importante se considerarmos que animais osmorreguladores podem ocupar estuários, que são ambientes instáveis, muitas vezes com grandes variações de salinidade, e que são constantemente alvo de poluição antrópica.



Independente de osmoconformador ou osmorregulador, esses animais apresentam células com mecanismos de defesa que variam com a intensidade da contaminação. Entretanto, o tecido branquial da espécie osmoconformadora parece se defender melhor do que a osmorreguladora.

Apesar de este trabalho ter identificado essas diferenças de susceptibilidade das espécies à contaminação por chumbo, muito do mecanismo de atuação do metal ainda ficou por ser elucidado. Acredita-se que o chumbo entre na célula, pelo menos em parte, via canais de  $\text{Ca}^{2+}$  em uma espécie quando o metal está associado à isosmoticidade e na outra quando está associado à hiposmoticidade. Dentro da célula, o chumbo parece mimetizar a sinalização por  $\text{Ca}^{2+}$  ativando vias de efluxo de  $\text{K}^+$  e/ou AQP. Para confirmar essa suspeita, será necessário ainda completar os dados de aquaporina, além de investir num inibidor de canais de  $\text{K}^+$ , o que será muito interessante uma vez que canais de  $\text{K}^+$  estão envolvidos com a RVD e também com o mecanismo de apoptose, duas questões levantadas na discussão, que abrem aqui linha de investigação de mecanismos de ação relevante para a toxicologia celular comparada.

Além disso, uma melhor caracterização do mecanismo de defesa nas células branquiais será necessária, com análise da expressão de possíveis homólogos da P-gp, além de testar o mecanismo MXR em situações de variação de salinidade, o que seria inédito na literatura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achard M., Baudrimont M., Boudou A., Bourdineaud J. P. 2004. **Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure.** Aquat. Toxicol. 67: 347-357.
- Ahearn G.A., Mandal P.K., Mandal A. 2004. **Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review.** J. Comp. Physiol. 174(B): 439-452.
- Ahern M.D., Morris S. 1998. **Accumulation of lead and its effects on Na<sup>+</sup> balance in the freshwater crayfish *Cherax destructor*.** J. Exp. Zool. 281: 270-279.
- Alfieri R.R., Petronini P.G. 2007. **Hyperosmotic stress response: comparison with other cellular stresses.** Pflugers Arch. – Eur. J. Physiol. 454: 173–185.
- Al-Mohanna S.Y., Subrahmanyam M.N.V. 2001. **Flux of heavy metal accumulation in various organs of the intertidal marine blue crab, *Portunus pelagicus* (L.) from the Kuwait coast after the Gulf War.** Environ. Int. 27: 321-326.
- Amado E.M., Freire C.A., Souza M.M. 2006. **Osmoregulation and tissue water regulation in the freshwater red crab *Dilocarcinus pagei* (Crustacea, Decapoda), and the effect of waterborne inorganic lead.** Aquat. Toxicol. 79: 1-8.
- Bard S.M. 2000. **Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organism.** Aquat. Toxicol. 48: 357-389.
- Barnes R.D., Harrison F.W. 1992. **Introduction to the decapoda.** Pp 1-6. In Harrison F.W. Ed. Microscopic Anatomy of Invertebrates, v 10 Decapod Crustacea. Wiley-Liss: New York.
- Beadford J.J., Leader J.P. 1978. **Hyperosmotic readjustment of the crab, *Hemigrapsus edwardsi*.** J. Comp. Physiol. 128(B): 147-151.
- Beeby A. 1978. **Interaction of lead and calcium uptake by the woodlouse, *Porcellio scaber* (Isopoda, Porcellionidae).** Oecologia 32: 255-262.
- Belyantseva I.A., Frolenkov G.I., Wade J.B., Mammamo F., Kachar B. 2000. **Water permeability of cochlear outer hair cells: characterization and relationship to electromotility.** J. Neurosci. 20(24): 8996-9003.
- Bianchini A., Grosell M., Gregory S.M., Wood C.M. 2002. **Acute silver toxicity in aquatic animals is a function of sodium uptake rate.** Environ. Sci. Technol. 36: 1763-1766.
- Bianchini A., Playle R.C., Wood C.M., Walsh P.J. 2005. **Mechanism of acute silver toxicity in marine invertebrates.** Aquat. Toxicol. 72: 67-82.

- Bortner C.D., Cidlowski J.A. 1998. **A necessary role for cell shrinkage in apoptosis.** *Biochem. Pharmacol.* 56: 1549-1559.
- Böttcher K., Siebers D. 1993. **Biochemistry, localization and physiology of carbonic anhydrase in the gills of euryhaline crabs.** *J. Exp. Zool.* 265: 397-409.
- Böttcher K., Siebers D. Senders S. 1995. **Carbonic anhydrase, a respiratory enzyme in the gills of the shore crab *Carcinus maenas*.** *Helgoland Mar. Resear.* 49: 737-745.
- Bradford, M.M. 1976. **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bridges C.C., Zalups R.K. 2005. **Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals.** *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204: 274-308.
- Brooks S.J., Mills C.L. 2003. **The effect of copper on osmoregulation in the freshwater amphipod *Gammarus pulex*.** *Comp. Biochem. Physiol.* 135(A): 527-537.
- Capó-Aponte J.E., Iserovich P., Reinach P.S. 2006. **Characterization of regulatory volume behavior by fluorescence quenching in human corneal epithelial cells.** *J. Membrane Biol.* 207: 11-22.
- Cardin V., Lezama R., Torres-Márquez M. E., Pasantes-Morales H. 2003. **Potential of the osmosensitive taurine release and cell volume regulation by cytosolic  $Ca^{2+}$  rise in cultured cerebellar astrocytes.** *Glia* 44: 119-128.
- Castilho P.C., Martins I.A., Bianchini A. 2001. **Gill  $Na^+, K^+$ -ATPase and osmoregulation in the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae).** *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 256: 215-227.
- Clark, M.E. 1968. **Free amino acid levels in the coelomic fluid and body wall of polychaetes.** *Bio. Bull.* 134: 35-47.
- Chung K-F., Lin H-C. 2006. **Osmoregulation and  $Na, K$ -ATPase expression in osmoregulatory organs of *Scylla paramamosain*.** *Comp. Biochem. Physiol.* 144(A): 48-57.
- Cooper A.R., Morris S. 1997. **Osmotic and ionic regulation by *Leptograpsus variegatus* during hyposaline exposure and in response to emersion.** *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 214: 263-282.
- Cruz L.N., Souza M.M. 2008. **Volume regulation mechanisms in *Rana catesbeiana* cardiac tissue under hyperosmotic stress.** *Zoology* 111: 287-294.

- Dunbar S.G., Coates M. 2004. **Differential tolerance of body fluid dilution in two species of tropical hermit crabs: not due to osmoticyionic regulation.** Comp. Biochem. Physiol. 137(A): 321-337.
- Engel D.W. 1977. **Comparison of the osmoregulatory capabilities of two portunid crabs, *Callinectes sapidus* and *C. similis*.** Mar. Biol. 41: 275-279.
- Erickson G.R., Alexopoulos L.G., Guilak F. 2001. **Hyper-osmotic stress induces volume change and calcium transients in chondrocytes by transmembrane, phospholipids, and G-protein pathways.** J. Biomech. 34: 1527-1535.
- Eufemia N.A., Epel D. 2000. **Induction of the multixenobiotic defense mechanism (MXR), P-glycoprotein, in the mussel *Mytilus californianus* as a general cellular response to environmental stresses.** Aquat. Toxicol. 49: 89-100.
- Felgenhauer B.E. 1992. **External anatomy and integumentary structures.** Pp 7-43. In Harrison F.W. Ed. Microscopic Anatomy of Invertebrates, v 10 Decapod Crustacea. Wiley-Liss: New York.
- Florkin M. 1962. **La régulation isosmotique intracellulaire chez les invertébre's Marins euryhalins.** Bull. Acad. Roy. Belg. Clin. Sci. 48:687-694.
- Force T., Bonventre J.V. 1994. **Cellular signal transduction mechanisms.** In Strange K. Ed. Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation. CRC press: Boca Raton.
- Foster C., Amado E.M., Souza M.M., Freire C.A. 2010. **Do osmoregulators have lower capacity of muscle water regulation than osmoconformers? A study on decapods crustaceans.** J. Exp. Zool. 313(A): 80-94.
- Freire C.A., Onken H., McNamara J.C. 2008a. **A structure function analysis of ion transport in crustaceans gills and excretory organs.** Comp. Biochem. Physiol. 151(A): 272-304.
- Freire C.A., Amado E.M., Souza L.R., Veiga M.P.T., Vitule J.R.S., Souza M.M., Prodocimo V. 2008b. **Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity.** Comp. Biochem. Physiol. 149(A):435-446.
- Genovese G., Ortiz N., Urcola M.R., Luquet C.M. 2005. **Possible role of carbonic anhydrase, V-H<sup>+</sup>-ATPase, and Cl/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger in eletrogenic ion transport across the gills of the euryhaline crab *Chasmagnatus granulatus*.** Comp. Biochem. Physiol. 142(A):362-369.
- Golovanova I.L. 2008. **Effects of heavy metals on the physiological and biochemical status of fishes and aquatic invertebrates.** Inland Water Biol. 1: 93-101.
- Goodman S.H., Cavey M.J. 1990. **Organization of a phyllobranchiate gill from the green shore crab *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda).** Cell Tissue Res. 260: 495-505.

- Gottesman M.M., Pastan I. 1993. **Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter.** Annu.Rev. Biochem. 62, 385–427.
- Grosell M., Brauner C., Killy S.P., McGeer J.C., Bianchini A., Wood C.M. 2002. **Physiological responses to acute silver exposure in the freshwater crayfish (*Combarus Diogenes Diogenes*) – a model invertebrate?** Environ. Toxicol. Chem. 23: 388-395.
- Grosell M., McDonald M.D., Walsh P.J., Wood C.M. 2004. **Effects of prolonged copper exposure in the marine gulf toadfish (*Opsanus beta*) II: copper accumulation, drinking rate and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in osmoregulatory tissues.** Aquat. Toxicol. 68: 263-275.
- Grosell M., Gerdes R., Brix K.V. 2006. **Influence of Ca, humic acid and pH on lead accumulation and toxicity in the fathead minnow during prolonged water-borne lead exposure.** Comp. Biochem. Physiol. 143C: 473-483.
- Gunnarson E., Axehult G., Baturina G., Zelenin S., Zelenina M., Aperia A. 2005. **Lead induces increased water permeability in astrocytes expressing aquaporin 4.** Neuroscience 136: 105-114.
- Hallows K.F., Knauf P.A. 1994. **Principles of cell volume regulation.** In Strange K. Ed. Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation. CRC press: Boca Raton.
- Hamann S., Kiilgaard J.K., Litman T., Alvarez-Leefmans F.J., Winther B.R., Zeuthen T. 2002. **Measurement of cell volume changes by fluorescence self-quenching.** J. Fluoresc. 12: 139-145.
- Hamdoun A.M., Griffin F.J., Cherr G.N. 2002. **Tolerance to biodegraded crude oil in marine invertebrate embryos and larvae is associated with expression of a multixenobiotic resistance transporter.** Aquat. Toxicol. 61: 127-140.
- Hansen J.I., Mustafa T., Depledge M. 1992. **Mechanisms of copper toxicity in the shore crab, *Carcinus maenas*.** Mar. Biol. 114: 253-257.
- Hebel D.K., Jones M.B., Depledge M.H. 1997. **Responses of crustaceans to contaminant exposure: a holistic approach.** Estuarine Coastal Shelf Sci. 44: 177-184.
- Henry R.P. 1988. **Multiple functions of gill carbonic anhydrase.** J. Exp. Zool. 248: 19–24.
- Henry R.P. 1991. **Techniques for measuring carbonic anhydrase activity in vitro.** Pp.119-126 In: Dodgson S.J., Tashian R.E., Gros G., Carter N.D. Eds. The carbonic anhydrase: cellular physiology and molecular genetics. Springer: New York.
- Henry R.P. 2001. **Environmentally mediated carbonic anhydrase induction in the gills of euryhaline crustaceans.** J. Exp. Biol. 204: 991–1002.

- Henry R.P. 2005. **Critical salinity, sensitivity, and commitment of salinity-mediated carbonic anhydrase induction in the gills of two euryhaline species of decapods crustaceans.** J. Exp. Zool. 303A: 45-56.
- Henry R.P., Watts S.A. 2001. **Early carbonic anhydrase induction in the gills of the blue crab, *Callinectes sapidus*, during low salinity acclimation is independent of ornithine decarboxylase activity.** J. Exp. Zool. 289: 350-358.
- Henry R.P., Garrelts E.E., McCarty M.M., Towle D.W. 2002. **Differential induction of branchial carbonic anhydrase and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase activity in the euryhaline crab, *Carcinus maenas*, in response to low salinity exposure.** J. Exp. Zool. 292:595-603.
- Henry R.P., Gehnrich S., Weihrauch D., Towle D.W. 2003. **Salinity-mediated carbonic anhydrase induction in the gills of the euryhaline green crab, *Carcinus maenas*.** Comp. Biochem. Physiol. 136(A): 243-258.
- Hoffmann E.K., Dunham P.B. 1995. **Membrane mechanisms and intracellular signaling in cell volume regulation.** In Kwang WJ, editor. Int. Rev. Cytol. 161:172-262.
- Hoffmann E.K., Lambert I.H., Pedersen S.F. 2009. **Physiology of cell volume regulation in vertebrates.** Physiol. Rev. 89: 193-277.
- IAP - Instituto Ambiental do Paraná. 2009. **Relatório de qualidade das águas 2005-2009.** Disponível em [www.iap.br](http://www.iap.br), acessado em 30/06/2010.
- Ivanina A.V., Sokolova I.M. 2008. **Effects of cadmium exposure on expression and activity of P-glycoprotein in eastern oysters, *Crassostrea virginica* Gmelin.** Aquat. Toxicol. 88: 19-28.
- Kempe D.S., Lang, P.A., Eisele K., Klarl B.A., Wiedee T., Huber S.M. Duraton C., Lang F. 2005. **Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by lead ions.** Am. J. Physiol. Cell Physiol. 288C: 396-402.
- Kepler C.J., Ringwood A.H. 2001a. **Expression of P-glycoprotein in southeastern oysters, *Crassostrea virginica*.** Mar. Environ. Res. 52: 81-96.
- Kepler C.J., Ringwood A.H. 2001b. **Expression of P-glycoprotein in the gills of oysters, *Crassostrea virginica*: seasonal and pollutant related effects.** Aquat. Toxicol. 54: 195-204.
- Kévers C., Péqueux A., Gilles R. 1979. **Effects of hypo- and hyperosmotic shocks on the volume and ions content of *Carcinus maenas* isolated axons.** Comp. Biochem. Physiol. 64(A): 427-431.

- Kingtong S., Chitramvong Y., Janvilisri T. 2007. **ATP-binding cassette multidrug transporters in Indian-rock oyster *Saccostrea forskali* and their role in the export of an environmental organic pollutant tributyltin.** Aquat. Toxicol. 85: 124–132.
- Kumar B.K., Rao Y.P., Noble T'O., Weddington K., McDowell V.P., Rajanna S., Bettaiya R. 2009. **Lead -induced alteration of apoptotic proteins in different regions of adult rat brain.** Toxicol. Letters 184: 56-60.
- Kurelec B. 1995. **Inhibition of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organism: ecotoxic consequences.** Sci. Total Environ. 171: 197-204.
- Kurelec B., Smital T., Pivcevic B., Eufemia N., Epel D. 2000. **Multixenobiotic resistance, P-glycoprotein, and chemosensitizers.** Ecotoxicology 9: 307-327.
- Lang F., Busch G.L., Ritter M., Völkl H., Waldegger S., Gulbins E., Häussinger D. 1998. **Functional significance of cell volume regulatory mechanisms.** Physiol. Rev. 78:247-306.
- Leguen I., Pisam M., Bidet M., Tauc M., Poujeol P. 1998. **pH<sub>i</sub> regulation and ultrastructural analysis in cultured gill cells from freshwater or seawater-adapted trout.** Fish Physiol. Biochem. 18: 297-309.
- Leguen I., Cravedi J.P., Pisam M., Prunet P. 2001. **Biological functions of trout pavement-like gill cells in primary culture on solid support: pH<sub>i</sub> regulation, cell volume regulation and xenobiotic biotransformation.** Comp. Biochem. Physiol. 128(A): 207-222.
- Leguen I., Prunet P. 2001. **In vitro effect of various xenobiotics on trout gill cell volume regulation after hypotonic shock.** Aquat. Toxicol. 53: 201-214.
- Leguen I., Prunet P. 2004. **Effect of hypotonic shock on cultured pavement cells from freshwater or seawater rainbow trout gills.** Comp. Biochem. Physiol. 137(A): 259-269.
- Leslie E.M., Deeley R.G., Cole S.P.C. 2005. **Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2 and BCRP (ABCG2) in tissue defense.** Toxicol. App. Pharmacol. 204: 216-237.
- Li S., Zhengyan Z., Xielai Z., Suhang L. 2008. **The effect of lead on intracellular Ca<sup>2+</sup> in mouse lymphocytes.** Toxicol. in vitro 22: 1815-1819.
- Litman T., Druley T.E., Stein W.D., Bates S.E. 2001. **From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance.** Cell. Mol. Life Sci. 58: 931-959.
- Loikkanen J., Chvalova K., Naarala J., Vähäkangas K.H., Savolainen K.M. 2003. **Pb<sup>2+</sup>-induced toxicity is associated with p53-independent apoptosis and enhanced by glutamate in GT1-7 neurons.** Toxicol. Letters 144: 235-246.

- López Mañanes A.A., Magnoni L.J., Goldemberg A.L. 2000. **Branchial carbonic anhydrase (CA) of gills of *Chasmagnatus granulata* (Crustacea Decapoda)**. Comp. Biochem. Physiol. 127(B): 85-95.
- López Mañanes A.A., Meligeni C.D., Goldemberg, A.L. 2002. **Response to environmental salinity of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase activity in individuals gills of the euryhaline crab *Cyrtograpsus angulatus***. J. Exp. Mar. Biol. and Ecol. 274: 75-85.
- Lovett D.L., Colella T., Cannon A.C., Lee D.H., Evangelisto A., Muller E.M., Towle D.W. 2006a. **Effect of salinity on osmoregulatory patch epithelia in gills of the blue crab *Callinectes sapidus***. Biol. Bull. 210:132-139.
- Lovett D.L., Verzi M.P., Burgents J.E., Tanner C.A., Glomski K., Lee J.J., Towle D.W. 2006b. **Expression profiles of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase during Acute and Chronic Hypo-osmotic Stress in The Blue Crab *Callinectes sapidus***. Bio. Bull. 211:58-65.
- Lucu Č., Towle D.W. 2003. **Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup> - ATPase in gills of aquatic crustacea**. Comp. Biochem. Physiol. 135(A): 195-214.
- McCarthy J.V., Cotter T.G. 1997. **Cell shrinkage and apoptosis: a role for potassium and sodium ion efflux**. Cell Death Differ 4: 756-770.
- Mahiques M.M., Burone L., Figueira R.C.L., Lavenère-Wanderley A.A.O., Capellari B., Rogacheski C.E., Barroso C.P., Santos L.A.S., Cordero L.M., Cussioli M.C. 2009. **Anthropogenic influences in a lagoonal environment: a multiproxy approach at the valo grande mouth, Cananéia-Iguape system (SE Brazil)**. Braz. j. oceanogr. 57: 325-337.
- Mantel L.H., Farmer L.L. 1983. **Osmotic and ionic regulation**. Pp 54-162. In: Mantel L.H. ed. The Biology of Crustacea, Internal Anatomy and Physiological Regulation, vol 5. Academic Press: New York.
- Marinelli R.A., Pham L., Agre P., LaRusso N.F. 1997. **Secretin promotes osmotic water transport in rat cholangiocytes by increasing aquaporin-1 water channels in plasma membrane**. J. Biol. Chem. 272: 12984-12988.
- Masui D.C., Furriel R.P.M., Mantelatto F.L.M., McNamara J.C., Leone F.A. 2003. **Gill (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase from the blue crab *Callinectes danae*: modulation of K<sup>+</sup>-phosphatase activity by potassium and ammonium ions**. Comp. Biochem. Physiol. 134B:631-640.
- Masui D.C., Furriel R.P.M., Silva E.C.C., Mantelatto F.L.M., McNamara J.C., Barrabin H., Scofano H.M., Fontes C.F.L., Leone F.A. 2005. **Gill microsomal (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase from the blue crab *Callinectes danae*: Interactions at cationic sites**. Int. J. Biochem. Cell Biol. 37:2521-2535.
- McCarty N.A., O'Neil R.G. 1992. **Calcium signaling in cell volume regulation**. Physiol. Rev. 72: 1037-1061.



- Meinild A.K., Klaerke D.A., Zeuthen T. 1998. **Bidirectional water fluxes and specificity for small hydrophilic molecules in aquaporins 0-5.** J. Biol. Chem. 273: 32446-32451.
- Melo G.A.S. **Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro.** 1996. Plêiade/FAPESP: São Paulo.
- Migliarini B., Campisi A.M., Maradonna F., Truzzi C., Annibaldi A., Scarponi G., Carnevali O. 2005. **Effects of cadmium exposure on testis apoptosis in the marine teleost *Gobius niger*.** Gen. Comp. Endocrinol. 142: 241-247.
- Minier C., Borghi V., Moore M.N., Porte C. 2000. **Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel, *Mytilus galloprovincialis*.** Aquat. Toxicol. 50: 167-176.
- Minier C., Forget-Leray J., Bjornstad A. Camus L. 2008. **Multixenobiotic resistance, acetylcholine esterase activity and total oxyradical scavenging capacity of the Arctic spider crab, *Hyas araneus*, following exposure to bisphenol A, tetra bromo diphenyl ether and diallyl phthalate.** Mar. Pollut. Bull. 56: 1410-1415.
- Moreau X., Saez G., Thiéry A., Clot-Faybesse O., Guiraudie-Capraz G., Bienboire-Frosini C., Martin C., De Jong L. 2008. **ELISA detection of multixenobiotic resistance transporter inductions in indigenous freshwater Chironomidae larvae (Diptera): A biomarker calibration step for *in situ* monitoring of xenobiotic exposure.** Environ. Pollut. 153: 574-581.
- Onken H., Riestenpatt S. 1998. **NaCl absorption across split gill lamellae of hyperregulating crabs, transport mechanisms and their regulation.** Comp. Biochem. Physiol. 119(A): 883-893.
- Onken H., Tresguerres M., Luquet C.M. 2003. **Active NaCl absorption across posterior gills of hyperosmoregulating *Chasmagnathus granulatus*.** J. Exp. Biol. 206: 1017-1023.
- Palacios E., Bonilla A., Luna D., Racotta I.S. 2004. **Survival, Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase and lipid responses to salinity challenge in fed and starved white pacific shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae.** Aquaculture 234: 497-511.
- Pasantes-Morales H, Morales-Mulia S. 2000. **Influence of calcium on regulatory volume decrease: role of potassium channels.** Nephron. 86(4): 414-27.
- Pavicic-Hamer D., Devescovi, M. Lucu Č. 2003. **Activation of carbonic anhydrase in branchial cavity tissues of lobsters (*Homarus gammarus*) by dilute seawater exposure.** J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 287: 79-92.
- Péqueux A. 1995. **Osmotic regulation in crustaceans.** J. Crust. Biol. 15:1-60.

- Pessatti M.L., Resgalla Jr C., Reis Fo. R.W, Kuehn J., Salomão L.C., Fontana J.D. 2002. **Variability of filtration and food assimilation rates, respiratory activity and multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in the mussel *Perna perna* under lead influence.** Braz. J. Biol. 62(4A): 651-656.
- PETROBRAS, S.A. **A gasolina tem chumbo?** Disponível em: <http://www.br.com.br/portalbr/> Acessado em 13/12/ 2006.
- PHS - Public Health Service – U.S. Department of health and human services. 2005. **Draft toxicological profile for lead.** Public Health service, U.S.
- Pierce S.K. 1982. **Invertebrate cell volume control mechanisms: a coordinated use of intracellular amino acid and inorganic ions as osmotic solute.** Biol. Bull. 183: 405-419.
- Piller S.C., Henry R.P., Doeller J.E., Kraus D.W. 1995. **A comparison of the gill physiology of two euryhaline crab species, *Callinectes sapidus* and *Callinectes similis*: energy production, transport-related enzymes and osmoregulation as a function of acclimation salinity.** J. Exp. Biol. 198: 349-358.
- Playle R.C. 2004. **Using multiple metal-gill binding models and the toxic unit concept to help reconcile multiple-metal toxicity results.** Aquat. Toxicol. 67: 359-370.
- Quabius E.S., Balm P.H.M.; Wendelaar Bonga, S. 1997. **Interrenal stress responsiveness of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is impaired by dietary exposure to PCB 126.** Gen. Comp. Endocrinol. 108: 472-482.
- Rabaud N.E., Song L., Wang Y., Agre P., Yasui M., Carbre J.M. 2009. **Aquaporin 6 binds calmodulin in a calcium-dependent manner.** Biochem Biophys Res Commun 383: 54-57.
- Rainbow P.S. 1995. **Physiology, Physicochemistry and metal uptake – a crustacean perspective.** Mar. Pollut. Bull. 31: 55-59.
- Rainbow P.S. 1997. **Ecophysiology of trace metal uptake in crustaceans.** Estuarine Coastal Shelf Sci. 44: 169-175.
- Rogers J.T., Richards J.G., Wood C.M. 2003. **Ionoregulatory disruption as the acute toxic mechanism for lead in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** Aquat. Toxicol. 64: 215-234.
- Romero D., Hernández-García A., Tagliati C.A., Martínez-López E., García-Fernández A.J. 2009. **Cadmium- and lead-induced apoptosis in mallard erythrocytes (*Anas platyrhynchos*).** Ecotoxicol. Environ. Saf. 72: 37-44.
- Roy L.A., Davis D. A., Saoud I.P., Henry R.P. 2007. **Branchial carbonic anhydrase activity and ninhydrin positive substances in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, acclimated to low and high salinities.** Comp. Biochem. Physiol. 147(A): 404-411.

- Ruiz J.L., Souza M.M. 2008. **Osmotic stress and muscle tissue volume response of a freshwater bivalve.** Comp. Biochem. Physiol. 151(A): 399-406.
- Russel J.M. 2000. **Sodium-Potassium-Chloride cotransport.** Physiol. Rev. 80(1): 211-276.
- Sandbacka M. Pärt P. Isomaa B. 1999. **Gill epithelial cells as tools for toxicity screening – comparison between primary cultures, cells in suspension and epithelia on filters.** Aquat. Toxicol. 46: 23-32.
- Sandrine P., Marc P. 2007. **Identification of multixenobiotic defence mechanism (MXR) background activities in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* as reference values for its use as biomarker in contaminated ecosystems.** Chemosphere 67: 1258–1263.
- Santore R.C., Di Toro D.M., Paquin P.R. 2000. **A biotic ligand model of the acute toxicity of metals II. Application to acute copper toxicity in freshwater fish and daphnia.** Technical report, Environmental Protection Agency, Office of Water Regulations and Standards, Washington, DC.
- Santos M.C.F., Moreira G.S. 1999. **Time course of osmoionic compensations to acute salinity exposure in the ghost crab *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787).** J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 235: 9-104.
- Sharifi A.M., Baniasadi S., Jorjani M., Rahimi F., Bakhshayesh M. 2002. **Investigation of acute lead poisoning on apoptosis in rat hippocampus in vivo.** Neurosc. Letters 329: 45-48.
- Shúilleabháin S.N., Davoren M., Mothersill C., Sheehan D., Hartl M.G.J., Kilemade M., O'Brien N.M., O'Halloran J., Van Pelt F.N.A.M., Lyng F.M. 2005. **Identification of a multixenobiotic resistance mechanism in primary cultured epidermal cells from *Oncorhynchus mykiss* and the effects of environmental complex mixtures on its activity.** Aquat. Toxicol. 73: 115-127.
- Silvestre F., Trausch G., Devos P. 2005. **Hyper-osmoregulatory capacity of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) exposed to cadmium: acclimation during chronic exposure.** Comp. Biochem. Physiol. 140(C): 29 – 37.
- Simons T.J. 1993. **Lead transport and binding by human erythrocytes in vitro.** Pfluegers Arch. 423: 307-313.
- Smith Jr L.H., Pierce S.K. 1987. **Cell volume regulation by molluscan erythrocytes during hypoosmotic stress:  $\text{Ca}^{2+}$  effects on ionic and organic osmolyte effluxes.** Biol. Bull. 173: 407-418.
- Smith T.W., Rasmusson R.L., Freudenrich C.C., Lieberman M. **Role of  $\text{Ca}^{2+}$  in myocardial volume regulation.** Circulation, v.86, p.480, 1992.

- Smital T., Sauerborn R., Pivcevic B., Krca S., Kurelec B. 2000. **Interspecies differences in P-glycoprotein mediated activity of multixenobiotic resistance mechanism in several marine and freshwater invertebrates.** Comp. Biochem. Physiol. 126(C): 175-186.
- Smital T., Sauerborn R. 2002. **Measurement of the activity of multixenobiotic resistance mechanism in the common carp *Cyprinus carpio*.** Mar. Environ. Res. 54: 449-453.
- Souza M.M., Scemes E. 2000. **Volume changes in cardiac ventricles from *Aplysia brasiliana* upon exposure to hyposmotic shock.** Comp. Biochem. Physiol. 127(A): 99-111.
- Souza M.M., Boyle R.T., Lieberman M. 2000. **Different physiological mechanism control isovolumetric regulation and regulatory volume decrease in chick embryo cardiomyocytes.** Cell Biol. International. 24: 713-721.
- Spokas E.G., Crivellone M.D. Kemp F. Bodgen J.D. Cohen G.M. 2002. **Characterization of Sodium, Potassium, ATPase activity in the gills of *Pimephales promelas* (Fathead Minnow): Influence of in vitro exposure to lead.** Bull. Environ. Contam. Toxicol. 69:384-392.
- Strange K. 2004. **Cellular volume homeostasis.** Rev. Adv. Physiol. Educ. 28: 155-159.
- Taylor H.H., Taylor E.W. 1992. **Gills and lungs: the exchange of gases ions.** Pp 203-293. In Harrison F.W. Ed. Microscopic Anatomy of Invertebrates, v 10 Decapod Crustacea. Wiley-Liss: New York.
- Thévenod F. Friedman J.M., Katsen A.D. Hauser I.A. 2000. **Up-regulation of multidrug resistance p-glycoprotein via nuclear factor-kB activation protects kidney proximal tubule cells from cadmium-and reactive oxygen species-induced apoptosis.** J. Biol. Chem. 275: 1887-1896.
- Timofeyev M.A., Shatilina Z.M., Bedulina D.S. Menzel R. Steinberg C.E.W. 2007. **Natural organic matter (NOM) has the potential to modify the multixenobiotic resistance (MXR) activity in freshwater amphipods *Eulimnogammarus cyaneus* and *E. verrucosus*.** Comp. Biochem. Physiol. 146(B): 496-503
- Togni V.G. 2007. **Efeito da salinidade sobre a resposta do sistema antioxidante e expressão de Hsp70 em siris (gênero *Callinectes*).** Tese de doutorado, Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, UFPR, Curitiba, Pr.
- Towle D.W., Palmer C.E., Harris D.L. 1976. **Role of gill Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-dependent ATPase in acclimation of blue crab (*Callinectes sapidus*) to low salinity.** J. Exp. Zool. 196: 315-321.
- Tulasi S. J., Yasmeeen R., Reddy C.P., Ramana Rao J.V. 1987. **Lead Uptake and Lead Loss in the Fresh Water Field Crab, *Barytelphusa guerini*, on Exposure to Organic and Inorganic Lead.** Bull. Environ. Contam. Toxicol. 39:63-68

- Vitale A.M., Monserrat J.M., Castilho P., Rodriguez E.M. 1999. **Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae).** Comp. Biochem. Physiol. 122(C): 121-129.
- Watanabe S., Kanekp T., Aida K. 2005. **Aquaporin-3 expressed in the basolateral membrane of gill chloride cells in Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* adapted to freshwater and seawater.** J. Exp. Biol. 208: 2673-2682.
- Wehner F., Olsen H., Tinel H., Kinne-Saffran E., Kinne R.K.H. 2003. **Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction.** Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 148: 1-80.
- Wheatly M.G., Henry R.P. 1987. **Branchial and antennal gland  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -dependent ATPase and carbonic anhydrase activity during salinity acclimation of the euryhaline crayfish *Pacifastacus leniusculus*.** J. Exp. Biol. 133: 76-86.
- WHO - World Health Organization. 1996. **Biological monitoring of chemical exposure in the workplace – Guidelines.** World Health Organization, Geneva, Suíça, v.1.
- Wood C.M., Gilmour K.M., Pärt P. 1998. **Passive and active transport properties of a gill model , the cultured branchial epithelium of the freshwater rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*).** Comp. Biochem. Physiol. 119(A): .87 – 96.
- Wood C.M., Kelly S.P., Zhou B., Fletcher M., O'Donnell M., Eletti B., Pärt P. 2002. **Cultured gill epithelia as models for the freshwater fish gill.** Biochim. at Biophys. Acta 1566: 72-83.
- Wright D.A. 1995. **Trace metal and major ion interactions in aquatic animals.** Mar. Pollut. Bull. 31: 8-18.
- Žaja R., Klobučar G.I.V., Klobučar R.S., Hackenberger B.K., Smital T. 2006. **Haemolymph as compartment for efficient and non-destructive determination of P-glycoprotein (Pgp) mediated MXR activity in bivalves.** Comp. Biochem. and Physiol. 143(C): 103-112.
- Zhou J., He W., Wang W., Yang C., Wang L., Xin Y., Wu J., Cai D., Liu W. Wang A. 2009. **Molecular cloning and characterization of an ATP-binding cassette (ABC) transmembrane transporter from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*.** Comp. Biochem. Physiol. 150(C): 450-458.
- Zucco F., De Angelis I., Testai E., Stamatii A. 2004. **Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after.** Toxicol. in Vitro 18: 153-163.